ANNALES DE TECHNOLOGIE AGRICOLE

VOLUME 15
1966

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle - PARIS-7e

ANNALES
DE
TECHNOLOGIE
AGRICOLE

VOLUME 15 1966 NUMÉRO 1

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle - PARIS-7e

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs et de l'Institut national de la Recherche agronomique, à l'exception des sommaires et résumés.

Ann. Technol. agric., 1966, **15** (1), 5-71

SUR LE COMPORTEMENT DE DEUX TYPES DE MICROORGANISMES ET DE DIFFÉRENTS ENZYMES EN PRÉSENCE DE PRODUITS DE LA RÉACTION DE MAILLARD (1)

M. JEMMALI et L. PETIT

Laboratoire de Biochimie et Physicochimie des Céréales et leurs Dérivés
C.E.R.D.I.A., le Noyer-Lambert, Massy (Essonne)

SOMMAIRE

I. — INTRODUCTION

Historique.
Réaction de MAILLARD du point de vue physico-chimique
Réaction de MAILLARD du point de vue physiologique
Objet du travail

II. — PRÉPARATION ET ANALYSE DES PRÉMÉLANOÏDES

1° Préparation
2° Techniques de dosage :
3° Résultats analytiques
4° Stérilisation des prémélanoïdines

III. — PREMIÈRE PARTIE : ACTION DES PRÉMÉLANOÏDINES SUR DEUX TYPES DE MICROORGANISMES.

A. — FERMENTS LACTIQUES

B. — FERMENTS CITRIQUES.

IV. — DEUXIÈME PARTIE : ACTION DES PRÉMÉLANOÏDINES SUR DIFFÉRENTS ENZYMES.

INTRODUCTION.

(1) Ce travail a fait l'objet d'une thèse de Doctorat ès Sciences naturelles soutenue par M. JEMMALI le 6 mai 1965 à la Faculté des Sciences de l'Université de Paris.

1° La pyruvate décarboxylase.

2° La lactacte déshydrogénase.

3° La Pyruvate décarboxylase oxydative.

Conclusion.

V. — Résumé.

Bibliographie.

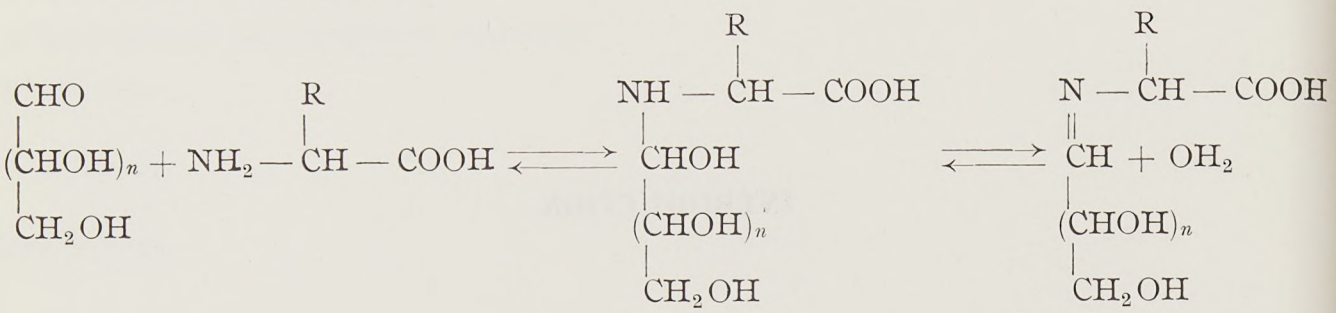
INTRODUCTION

C'est en 1912 que MAILLARD (1) décrivit de façon systématique la réaction entre sucre et amino-acide : lorsqu'on chauffe des mélanges aqueux de divers sucres réducteurs et d'amino-acides, on voit se développer une coloration jaune qui vire vers le brun foncé ; à un certain stade de la réaction se produit un dégagement de gaz carbonique que MAILLARD attribuait à une décomposition du groupe carboxylique de l'acide aminé. Cette réaction entraîne finalement la précipitation de produits insolubles dans l'eau, du genre « humus », les mélanoïdines. On se propose d'appeler « prémélanoïdines » tous les composés autres que les deux molécules initiales et les mélanoïdines proprement dites. Par la suite, MAILLARD, en 1913, montrait aussi que les polypeptides se comportaient de même en présence de sucres réducteurs. Depuis, on a appelé réaction de MAILLARD l'ensemble des interactions glucides réducteurs-protides, et on a montré que la phase de précipitation terminale était l'aboutissement d'une longue chaîne de réactions mettant en jeu des composés solubles, colorés ou non, dont l'identité de la plupart nous est encore inconnue.

Depuis les études de MAILLARD beaucoup de travaux ont été effectués pour mieux connaître la réaction. Plusieurs mises au point bibliographiques permettent de prendre une vue d'ensemble de ces travaux : ENDERS en 1938 (2), STADTMAN en 1948 (3), DANEHY et PIGMAN en 1951 (4), HODGE en 1953 (5), ELLIS en 1959 (6) et REYNOLDS en 1963 (7).

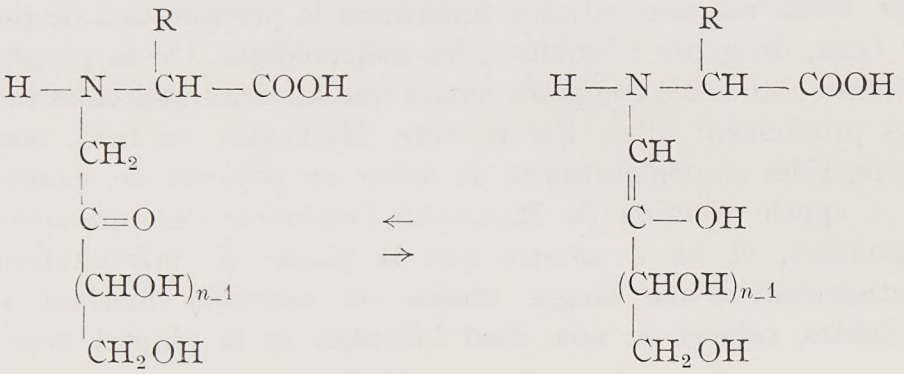
Cette réaction de MAILLARD est donc une réaction de brunissement, mais elle n'est pas la seule à donner naissance à des colorations à partir d'un matériel biologique ; ce brunissement n'est pas non plus la seule caractéristique de la réaction. Cette dernière s'accompagne en effet toujours d'un abaissement du pH, de l'apparition d'un pouvoir réducteur, d'un développement de fluorescence et d'une forte absorption dans l'ultraviolet ; celle-ci est due à la présence de composés carbonylés, aldéhydes et cétones. Une publication de CHICHESTER (8) illustre la complexité du milieu ; cet auteur travaille avec du glucose uniformément marqué au ^{14}C et avec du glycocolle marqué sur le carbonyle ; après chromatographie bidimensionnelle sur papier d'une préparation obtenue par chauffage de glucose et de glycocolle marqués, il repère des composés différents, dont dix-huit fluorescents, cinq réducteurs et trois réagissant à la ninhydrine au même titre que le glycocolle final. Ce nombre est, sans aucun doute, un minimum car il pourrait y avoir des composés non décelés et des taches superposées sur le chromatogramme. En 1953, HODGE (5) a tenté de faire une synthèse rassemblant les faits bien établis et les hypothèses vraisemblables. Il a divisé en trois étapes principales cette réaction complexe.

1° Dans un premier stade, la molécule de sucre et celle d'amino-acide donnent un composé d'addition :



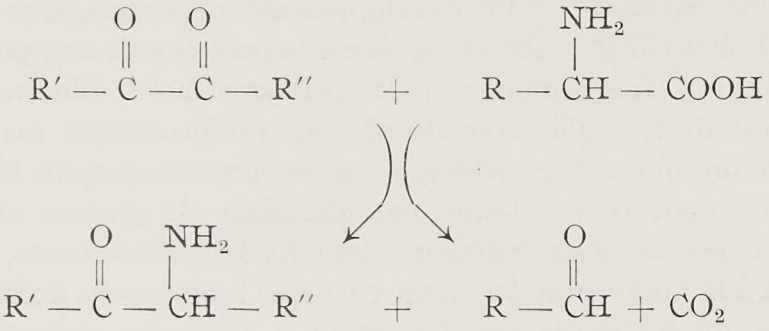
Base de SCHIFF

On obtient ainsi vraisemblablement une base de SCHIFF qui s'isomérise elle-même en N-glycosyl amine N-substituée. Celle-ci subit à son tour une isomérisation par un ré-arrangement de AMADORI, et l'on aboutit finalement à un 1-amino, 1-déoxy, 2-cétose.



Les composés rencontrés dans cette première phase appartiennent en propre au brunissement de type MAILLARD.

2° Dans un deuxième stade, cet amino-déoxy-cétose peut être décomposé selon deux processus : soit par scission, soit par déshydratation. C'est alors qu'apparaissent les petites molécules comme l'acétol, le méthyl-glyoxal, le diacétyle, les aldéhydes glycoliques et glycériques, les dérivés furfuryliques, les réductones. Ces composés donnent une réaction de STRECKER (9) avec l'amino-acide, réaction de transamination et de décarboxylation ; on obtient ainsi un aldéhyde à chaîne plus courte que celle de l'amino-acide initial.



Ce sont les aldéhydes formés à ce stade qui sont pour une grande part responsables de l'absorption ultraviolette et de parfums caractéristiques de la réaction de MAILLARD.

3° Enfin, dans un troisième stade, ces divers composés carbonylés et aminés peuvent réagir entre eux pour donner aldimines et cétimines facilement polymérisables : les composés aldéhydiques se combinant les uns aux autres pour former les aldols. Ainsi, par condensation et polymérisation successives, la chaîne des réactions aboutit à la formation de composés fluorescents et de pigments bruns.

Un certain nombre de paramètres conditionnent, par ailleurs, le déroulement de la réaction de MAILLARD : la température qui joue un rôle très important sur l'intensité du brunissement, la durée de la réaction, le pH et l'hydratation du milieu.

Dès 1914, MAILLARD s'interrogeait sur les éventuelles conséquences biologiques de cette réaction, lorsqu'elle se développe dans des milieux naturels. Elle est en effet susceptible de se produire en de multiples occasions, au cours des traitements subis par les substances alimentaires destinées aux organismes supérieurs, ou par les milieux nutritifs de microorganismes : chauffage, cuisson, stérilisation, conservation de longue durée en milieu faiblement hydraté, etc. Mais, si la physico-chimie de la réaction de MAILLARD a fait l'objet de nombreuses recherches, l'étude de ses répercussions physiologiques a été encore assez peu poussée. Elle a d'abord été menée dans deux directions : en premier lieu, il était évident que la réaction de MAILLARD entraînerait une certaine perte de valeur biologique du fait de la destruction de constituants glucidiques et de constituants protidiques dont elle s'accompagne. De nombreux auteurs, en particulier PATTON et HILL (10, 11), ont cherché à préciser, selon les modalités de la réaction et selon la nature du milieu, l'importance des destructions ainsi provoquées. En second lieu, et pour rendre compte de faits non justifiés par la seule explication précédente, on a émis l'hypothèse selon laquelle, au cours de la réaction, une molécule de glucide initial ou d'un dérivé pourrait venir se greffer sur la chaîne peptidique et gêner, ainsi, l'action ultérieure des enzymes protéolytiques : dans ces conditions, non seulement la réaction de MAILLARD entraînerait une destruction des glucides et des protides, mais la fraction résiduelle de ces derniers pourrait encore voir sa valeur biologique diminuée par une plus grande résistance à l'hydrolyse enzymatique, par empêchement stérique. Sans que l'on puisse dire qu'une preuve irréfutable ait été apportée, MENDEN et CREMER (12) ont fait des essais de digestibilité *in vitro* par la pancréatine sur les protéines du lait chauffé en présence de glucose et ont constaté une diminution de l'attaque pancréatique.

Les travaux effectués sur les microorganismes sont, eux aussi, assez fragmentaires. Citons ceux de ORLA JENSEN en 1933, de SMILEY, NIVEN et SHERMAN en 1943, de RABINOWITZ et SNELL en 1947, de PATTON et HILL en 1948, de PETERSON et ROSE en 1949, de C. S. ROSE en 1952, de FOSTER en 1952, de DEXTERS, KING et CHELDELIN en 1953, de Mc ALLISTER en 1954, de PARKER et ELLIKER en 1954, de ZABRODSKY en 1958, de SHEIKH, GODON et PETIT en 1961. Nous reverrons en détail chacun de ces auteurs au moment d'exposer les recherches effectuées sur les différents microorganismes étudiés. Les résultats obtenus par ces derniers auteurs ont permis d'émettre et d'étayer une troisième hypothèse : celle d'une action propre de certains produits de la réaction de MAILLARD sur le métabolisme des microorganismes.

Le travail que nous avons effectué se rattache à cette dernière hypothèse : il a eu pour but, d'une part, d'élargir le champ des observations à d'autres microorganismes, d'autre part, de compléter les études déjà faites sur *Saccharomyces cere-*

visiae (13) et de vérifier l'hypothèse selon laquelle, même *in vitro*, les prémélanoïdines pouvaient agir comme effecteurs de la décarboxylase pyruvique. Afin de montrer que cette action ne caractérise pas uniquement la décarboxylase, nous avons étudié l'influence de ces prémélanoïdines sur l'alcool déshydrogénase, la lactate déshydrogénase et la pyruvate décarboxylase oxydative.

Nous avons limité les observations aux seules prémélanoïdines dérivées du glucose et du glycocolle ; maintenant constantes les conditions de concentration et de température, nous avons fait varier la composition des prémélanoïdines en agissant sur le temps de réaction. Par ailleurs, l'action de chaque préparation a été étudiée à des concentrations différentes puisqu'il avait été montré que, dans le cas de la levure, la concentration des prémélanoïdines dans le milieu de culture pouvait influer sur le sens même des phénomènes observés.

En ce qui concerne les microorganismes, nous avons utilisé trois souches de bacilles lactiques (*L. arabinosus*, *L. casei* et *L. acidophilus*), deux souches d'*Aspergillus* (*A. niger* et *A. wentii*). Nous avons choisi ces microorganismes pour différentes raisons : d'une part, parce qu'il nous a paru intéressant d'étudier le comportement d'une bactérie et d'une moisissure, d'autre part, parce qu'ils sont appelés, à des degrés divers, à se développer dans un milieu contenant normalement des mélanoïdines : les moûts industriels provenant des mélasses de sucrerie, les milieux biologiques qui contiennent des composés aminés et des sucres réducteurs et qui sont généralement autoclavés ; parce que, enfin, leur métabolisme est orienté — au moins partiellement — dans le même sens et facile à étudier. Les mesures effectuées ont porté, soit sur les produits du métabolisme, soit sur le développement des microorganismes ; elles seront précisées dans chaque cas particulier.

Dans l'exposé qui va suivre, nous commençons par décrire les méthodes générales utilisées dans l'ensemble du travail :

— préparation des prémélanoïdines,
— techniques de dosage,
— résultats analytiques.

Puis, nous exposerons les recherches effectuées *in vivo* avec chacun des microorganismes ; les techniques particulières employées dans chaque cas seront décrites avant de rapporter les résultats obtenus par action des prémélanoïdines.

Enfin, nous étudierons l'action des prémélanoïdines sur les différents systèmes enzymatiques *in vitro*.

PRÉPARATION ET ANALYSE DES PRÉMÉLANOÏDINES

1° Préparation

On prépare des solutions de glucose et de glycocolle de molarité 2 : on introduit 10 ml de chaque solution dans un tube rodé ; après homogénéisation du mélange, on fait chauffer à reflux à 90°C, pendant le temps nécessaire. Les temps de chauffage ont été compris entre 2 et 48 heures, et on a laissé le pH évoluer librement vers les valeurs acides ; dans ces conditions, il n'y a pas eu précipitation de mélanoïdines. Après refroidissement, la préparation de prémélanoïdines est ajustée à un volume de 50 ml.

2° Techniques de dosage

Dans l'impossibilité où l'on est de pouvoir analyser complètement ces milieux complexes dont l'identité de la majeure partie des composants est encore inconnue, nous les avons caractérisés par la teneur en glucose et en glycocolle résiduels qui permettent de calculer les quantités entrées en réaction ; par le relevé des spectres d'absorption dans l'ultraviolet, afin de repérer leurs teneurs en composés carbonylés ; par la mesure du pH et du pouvoir réducteur total.

Le dosage des sucres et des amino-acides dans un mélange de prémélanoïdines demande quelques précautions, car, au cours de la réaction de MAILLARD, se forment des composés susceptibles de présenter des propriétés chimiques analogues à celles sur lesquelles sont fondées les méthodes usuelles de ces deux constituants. C'est pourquoi il est préférable de séparer le sucre et l'amino-acide de l'ensemble du mélange avant de les doser. Néanmoins, le glucose a été dosé par la méthode à la glucose-oxydase (14), appliquée directement à la préparation ; on a comparé les résultats obtenus de cette façon à ceux donnés par la méthode chimique après séparation.

Glucose

a) *Dosage par voie enzymatique dans le milieu complexe* : méthode à la glucose-oxydase, de HUGGETT et NIXON (14).

Le principe du dosage est le suivant : par une réaction d'oxydation catalysée par la glucose-oxydase, le glucose est transformé en acide gluconique avec libération d'eau oxygénée ; ce dernier, en présence de peroxydase, réagit avec un donateur d'hydrogène, l'ortho-dianisidine (DH_2) pour former un colorant rouge. Cette

coloration est proportionnelle à la quantité de glucose dans le milieu ; on mesure l'intensité de celle-ci à 436 mμ :

$$\text{Glucose} + H_2O \xrightarrow[O_2]{\text{Glucose-oxydase}} \text{Acide gluconique} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + DH_2 \xrightarrow{\text{Peroxydase}} 2H_2O + D \text{ (colorant)}$$

Rappelons brièvement le mode opératoire : à 1 ml de solution de prémélanoïdines convenablement diluée, on ajoute 5 ml du mélange tampon-enzyme-chromogène (Biotrol). La réaction se développe à l'obscurité pendant 30 minutes. La courbe-étalon doit être établie pour chaque série de dosages avec le réactif tampon-enzyme-chromogène préparé extemporanément ; la meilleure zone de concentration pour ce dosage se situe entre 20 et 60 γ pour 1 ml de prise d'essai. La précision du dosage est de l'ordre de 2 p. 100.

b) *Dosage par voie chimique, après séparation du glucose* :

On isole le glucose par filtration de la solution de prémélanoïdines à travers une colonne de résine échangeuse de cations. On utilise le DOWEX D 50 × 8,50 — 100 dont on a constitué une colonne de 680 mm de hauteur et 17 mm de diamètre. Après lui avoir fait subir deux cycles de traitement NH_4OH (2N) — HCL (2N), suivis d'un lavage à l'eau distillée jusqu'à neutralité de l'effluent, on introduit une prise de 2 ml de la préparation de prémélanoïdines. On rince la colonne à l'eau distillée et on recueille l'effluent par fractions de 5 ml. Le volume de la prise d'essai étant faible par rapport à celui de la résine, il se produit en plus du phénomène d'échange d'ions, un classement des différents constituants de la solution analysée grâce à un processus d'ecclusion. La vitesse d'écoulement est réglée à la valeur de 1 ml en 2 minutes environ. On localise la position du glucose dans l'effluent par la réaction au phtalate d'aniline, effectuée sur une prise de 10 μl. En général, le glucose passe entre 50 et 130 ml. On recueille ces fractions et l'on dose le glucose par la méthode de SHAEFFER-HARTMANN(15), avec une précision de ± 2 p. 100. On effectue le calcul de sa concentration par référence à une solution étalon, traitée dans les mêmes conditions.

Glycocolle

On le sépare par chromatographie sur papier, dans un solvant monophasique constitué de butanol, de pyridine et d'eau, dans les proportions de 15/50/20. Après une dilution convenable, de manière que les prises d'échantillons de 10 μl apportent au maximum 15 γ d'amino-acide, le chromatogramme est traité d'après la méthode de THOMSON (16), qui consiste en un séchage à température ambiante, puis aspersion par une solution de ninhydrine à 0,5 p. 100 et chauffage à 60°C pendant 30 minutes en atmosphère de CO_2 et d'alcool. Signalons que l'on a utilisé avec de bons résultats la méthode de STARON (17). Les taches de glycocolle, nettement séparées de celles du N-glycoside qui réagissent également à la ninhydrine, sont découpées et éluées dans l'alcool à 50 p. 100. On mesure alors la densité optique des éluats à 570 mμ. On calcule ensuite la teneur en glycocolle par référence à la densité optique d'un éluat

correspondant à un dépôt de 10 µl de glycocolle soumis aux mêmes opérations que la prise d'échantillon à analyser. La précision globale est de l'ordre de ± 8 p. 100.

Spectres UV

Les spectres d'absorption dans l'ultraviolet ont été relevés avec un Spectronic 505 Bausch et Lomb, entre 220 et 370 mµ. La dilution est ajustée à une valeur convenable pour mesurer au mieux la densité optique au maximum d'absorption située dans la région de 280-300 mµ. *La figure* 1 représente les spectres entre 220 et 370 mµ

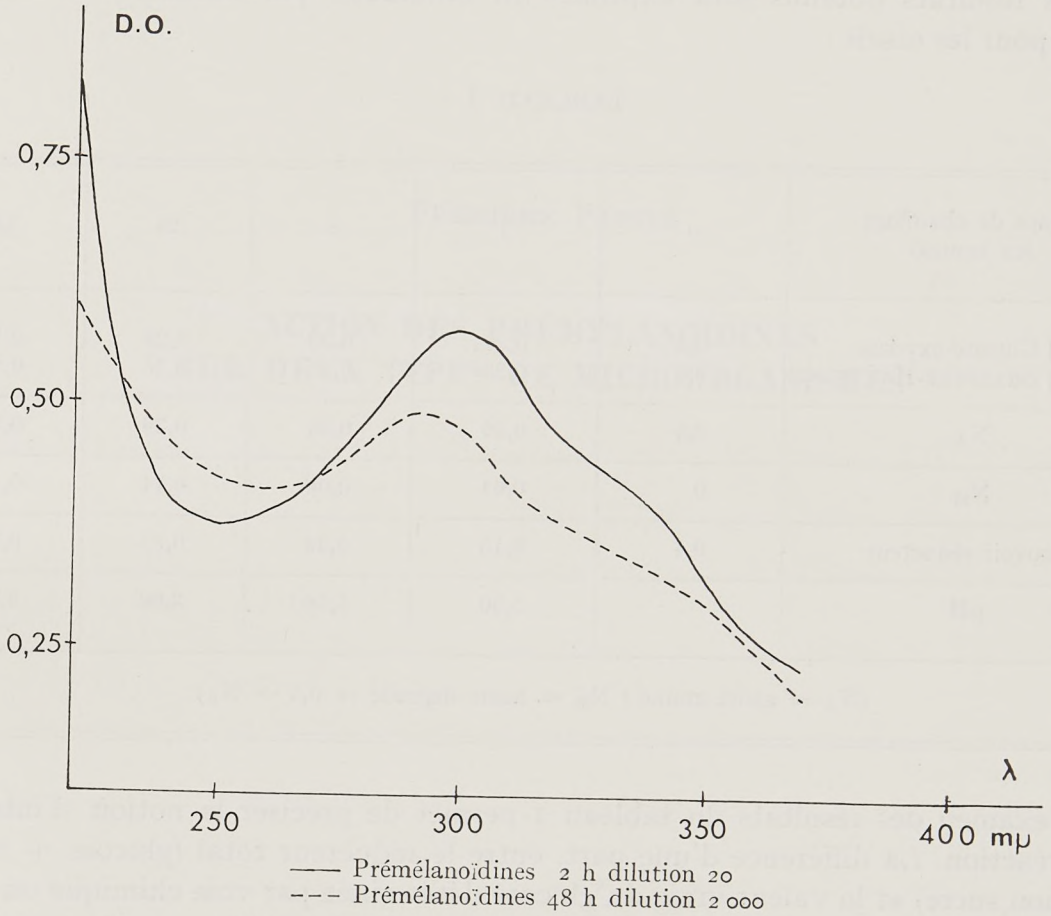


FIG. 1. — *Spectres d'absorption de prémélanoïdines.*

de deux préparations de prémélanoïdines 2 h et 48 h diluées respectivement 20 et 2 000 fois. Nous voyons que le maximum situé à 296 mµ pour la préparation à court temps de chauffage, se déplace vers 285-290 mµ pour la préparation à temps de chauffage prolongé, ce qui correspond à une accumulation de 5-hydroxyméthylfurfural (5 HMF) et à une diminution de la formation de «296» qui a été isolé par PETIT (18). De même, le contrefort entre 320 et 340 mµ, qui est bien défini pour la préparation 2 heures, s'estompe pour la préparation de 48 heures.

Pouvoir réducteur

Il a été déterminé par un dosage selon la méthode de SHAEFFER-HARTMANN (15), directement effectué sur une dilution convenable des préparations de prémélanoïdines ; le résultat est exprimé arbitrairement en glucose.

pH

Le pH est mesuré au Radiometer 25. Ce sont les valeurs de pH de préparations non diluées.

3° Résultats analytiques

Composition des prémélanoïdines

Les résultats obtenus sont exprimés en millimoles par millilitre de solution utilisée pour les essais :

TABLEAU I

Temps de chauffage (en heures)	0	2	8	24	48
Glucose — Glucose-oxydase	0,4	0,39	0,33	0,28	0,17
Glucose — Shaeffer-Hartmann	0,4	0,39	0,35	0,26	0,17
N_A	0,4	0,39	0,34	0,29	0,25
N_M	0	0,01	0,06	0,11	0,15
Pouvoir réducteur	0,4	0,43	0,39	0,35	0,28
pH		5,30	4,56	3,96	3,76

(N_A = azote aminé ; N_M = azote dégradé = 0,4 — N_A)

L'examen des résultats du tableau I permet de préciser la notion d'intensité de la réaction. La différence d'une part, entre le réducteur total (glucose + réducteurs non sucre) et la valeur vraie du glucose déterminée par voie chimique ou après séparation par voie enzymatique ; d'autre part, entre l'azote total et l'azote aminé, donne une idée de l'importance de l'évolution de la réaction en fonction du temps de chauffage.

4° Stérilisation des prémélanoïdines

On filtre la solution à travers une membrane Millipore (Jouan), type HA, ayant des pores de 0,45 μ de diamètre.

PREMIÈRE PARTIE

ACTION DES PRÉMÉLANOÏDINES SUR DEUX TYPES DE MICROORGANISMES

A. — FERMENTS LACTIQUES

1° État de la question

On a généralement mis en évidence une influence du chauffage du milieu de culture sur les bactéries lactiques : lorsqu'on chauffe un milieu biologique aux températures de stérilisation, il se produit des modifications qui influent d'une façon notable sur le développement des microorganismes. Un certain nombre d'auteurs ont essayé d'apporter une explication à ce phénomène selon qu'ils ont observé une stimulation ou une inhibition.

Dans le premier cas, ORLA JENSEN (19) attribue ce pouvoir de stimulation à des substances provenant de la décomposition par chauffage des sucres réducteurs contenus dans le milieu. RABINOWITZ et SNELL (20), SMILEY, NIVEN et SHERMAN (21) pensent qu'au cours du chauffage il se forme des substances réductrices responsables de l'effet stimulant ; les trois derniers auteurs suggèrent que des substances telles que l'acétaldéhyde et l'acide pyruvique peuvent jouer le rôle d'accepteurs d'hydrogène dans le métabolisme initial des hydrates de carbone ; en 1952, C. S. ROSE (22) découvre une action toxique sur *L. bifidus* de la cystéine autoclavée et montre en même temps que cette toxicité disparaît en chauffant la cystéine avec un sucre réducteur. D. ROSE et PETERSON (23) signalent un léger effet favorable du glucose chauffé dans le milieu de culture par comparaison au milieu de culture dans lequel le glucose a été autoclavé séparément. ROGERS., KING et CHELDELIN (24) constatent que le N-glucosyl-glycine (NGG), produit dans le premier stade de la réaction glucose-glycocolle, est capable d'activer la croissance de *Lactobacillus gayoni*. Dans un travail sur la nutrition des microorganismes (25), les deux derniers auteurs signalent que d'autres espèces telles que *L. acidophilus* et *Leuconostoc mesenteroïdes* répondent de même favorablement à ce NGG. RAMSEY et LANKFORD (26) ont mis en évidence une action activatrice du glucose chauffé en milieu phosphate sur de nombreux microorganismes et, en particulier, sur *L. fermenti*. Signalons que le phénomène observé par tous ces auteurs porte sur la phase initiale de croissance, c'est-à-dire consiste en un développement rapide des microorganismes à partir d'un faible « inoculum ». D'après AUCLAIR et PORTMANN (27), l'effet stimulant du lait autoclavé sur la croissance de *Lactobacillus lactis* 0_{37} serait dû, principalement à la présence dans ce lait d'acide formique produit à partir du lactose au cours du chauffage à l'autoclave.

Dans le cas d'une inhibition, signalons les travaux de FOSTER (28), de PARKER et ELLIKER (29), sur le lait ayant subi un chauffage prolongé : ces derniers auteurs

attribuent le pouvoir d'inhibition à une diminution de l'azote aminé libre due à la présence du lactose. Certains auteurs, comme PATTON et HILL (30), Mc ALLISTER (31), LANKFORD, RAVEL et RAMSEY (32), AUCLAIR en 1953 (33), expliquent l'effet défavorable de la stérilisation à l'autoclave des milieux de base contenant des sucres réducteurs, par une disparition de certains facteurs de croissance, et, en particulier, des acides aminés soufrés ; d'autres, comme AUCLAIR et PORTMANN en 1956 (34), FINKELSTEIN et LANKFORD (35), l'attribuent à la formation de substances inhibitrices.

A l'exception des travaux de ROGERS, KING et CHELDELIN (24), qui mettent en évidence d'une manière explicite les possibilités d'action de composés provenant de l'interaction du glucose et du glycocolle sur la croissance des bactéries lactiques, on peut dire que les publications énumérées ne permettent en aucune façon de conclure à une action propre des produits de la réaction de MAILLARD.

2° Techniques particulières utilisées

a) *Choix des conditions de travail*

Souches.

Les essais ont été conduits sur trois souches homofermentatives : *Lactobacillus arabinosus, Lactobacillus casei et Lactobacillus acidophilus* NCDO1. Elles sont entretenues sur milieu gélosé de DE MAN, ROGOSA et SHARPE (MRS) (36), avec repiquage hebdomadaire, puis, elles sont conservées à — 15°C.

Milieux de base.

Nous avons essayé deux types de milieux de culture, l'un synthétique, l'autre naturel. Avec le premier, le milieu de SNELL et WRIGHT (37), d'une part, il nous a été difficile d'obtenir des résultats reproductibles, d'autre part, la phase de latence est trop longue : elle dure parfois plus de dix heures ; nous admettons avec MONOD (38), que ce retard est dû à l'existence dans le milieu synthétique de substances toxiques, probablement des ions métalliques à l'état de traces et que la croissance au taux maximum ne peut s'établir qu'une fois cet effet toxique neutralisé ; de plus le milieu donne lieu assez souvent à la formation d'un précipité, sinon dès sa préparation, du moins pendant la croissance des cultures.

Avec le milieu naturel, les lactobacilles donnent une culture abondante et la phase de latence est courte du fait que les colloïdes que ce milieu renferme, jouent peut-être à l'encontre des substances toxiques, un rôle protecteur ; par contre, avec ce milieu, on ne peut éviter les actions parasites éventuelles des dérivés de la réaction de MAILLARD qui pourraient être apportés par les produits naturels (extraits de malt, de levure et de viande) ; finalement, nous avons porté notre choix sur deux milieux naturels : milieu de JOHNSON (39) et milieu MRS ; nous les avons légèrement modifiés, en limitant au minimum indispensable l'ajout du produit naturel

Qu'il s'agisse de l'un ou de l'autre, nous avons pu obtenir des cultures très denses, avec un temps de latence peu marqué (2 heures 30).

	Milieu de JOHNSON originel (g)	Milieu de JOHNSON appauvri (g)
Mélange salin glucosé	20	20
Extrait de levure (Difco)	10	1
Lait peptonisé (Difco)	10	1
Acétate de sodium	10	10

pH = 6,8. On amène à 1 000 ml avec de l'eau distillée.

La composition du *mélange salin glucosé* est la suivante :

	(g)
Glucose	1 000
PO_4H_2K	25
PO_4HK_2	25
SO_4Mg hydraté	10
SO_4Fe	1
SO_4Mn	1
ClNa	1

	Milieu MRS originel	Milieu MRS appauvri
Extrait de viande (Difco) (g)	10	2
Peptone (Difco) (g)	10	2
Extrait de levure (Difco) (g)	5	1
Glucose (g)	20	20
Acétate de sodium (g)	5	5
PO_4HK_2 (g)	2	2
Di-ammonium citrate (g)	2	2
SO_4Mg ($7H_2O$) (g)	0,200	0,200
SO_4Mn ($4H_2O$) (g)	0,050	0,050
Tween 80 (ml)	1	1

pH = 6,6. On amène à 1 000 ml avec de l'eau distillée.

Ces milieux étant suffisamment tamponnés, l'ajout de prémélanoïdines n'entraîne pas de variation du pH par rapport au témoin.

b) *Protocole microbiologique*

La veille du dosage, on repique la souche sur un milieu liquide de même composition que le milieu de base ; on laisse incuber cet « inoculum » pendant 20 h, à 30°C.

Au moment de l'emploi, on prend 0,5 ml de l'inoculum, on complète à 10 ml avec de l'eau distillée afin de diluer la culture et de pouvoir prélever exactement 1 ml destiné à l'ensemencement. La dose d'inoculum utilisée a été choisie au cours d'expériences préliminaires, de manière que les cultures des différentes souches parviennent à la fin de leur croissance maximum après 48 heures d'incubation. Pour éviter tout apport de produits de la réaction de MAILLARD provenant de la stérilisation du milieu par chauffage, nous stérilisons celui-ci par filtration à travers une membrane en amiante, stérilisante, type « EK » (EMACO). Les milieux ensemencés sont mis à incuber à 36°C.

c) *Appareils et modes opératoires*

Nous décrirons le mode opératoire et les méthodes différentes de dosage, selon qu'il s'agit d'étudier l'acidité, ou de suivre le développement des cultures bactériennes.

Dosage d'acide lactique.

Nous utilisons des tubes à essai 200 × 20, dans chacun desquels on met 10 ml de milieu de base ; on leur ajoute :

— soit 1 ml de la préparation de prémélanoïdines ;

— soit pour réaliser l'essai témoin, 1 ml d'un mélange de même composition en glucose et en glycocolle que la préparation étudiée, ceci pour des raisons que nous expliciterons plus loin. Pour doser l'acidité lactique, on transvase le contenu des tubes dans une série de béchers de 100 ml et on rince plusieurs fois avec de l'eau distillée en utilisant un volume d'environ 10 ml. On dose ensuite par la soude (0,1 N) ; lorsqu'on a affaire à un jus clair, on utilise du bleu de bromothymol comme indicateur coloré, quand il s'agit de milieu foncé dû à l'ajout de prémélanoïdines, on dose au pHmètre jusqu'à pH = 6,7.

Mesures néphélométriques.

L'appareil utilisé est le biophotomètre de Bonet-Maury et Jouan qui permet d'enregistrer automatiquement l'évolution dans le temps de l'opacité des milieux de culture. Il comporte six cuves disposées circulairement dans une enceinte thermostatique autour d'une source de lumière. Le faisceau lumineux traverse successivement un diaphragme réglable, la cuve à culture à faces parallèles et tombe sur une cellule photoélectrique. Chacune de ces cellules, correspondant à chacune des cuves, est reliée à un galvanomètre enregistreur multivoies ; ce dernier est commuté automatiquement toutes les 20 secondes sur chacune des six cellules : la courbe correspondant à chaque faisceau traduit en pourcentage de transmission la variation d'opacité du contenu à mesurer. A l'intérieur de chaque cuve, se trouve un barreau aimanté permettant une agitation électromagnétique régulière. Chacune d'elles contient 10 ml de milieu de base auquel on ajoute :

soit 1 ml de prémélanoïdines ;
soit 1 ml de glucose-glycocolle.

3° Résultats expérimentaux

a) *Action propre du glucose et du glycocolle*

Nous avons cherché d'abord à établir si le glucose et le glycocolle apportés par les prémélanoïdines jouaient le rôle de facteurs limitants dans ces milieux ; nous avons ajouté des doses croissantes de glucose et de glycocolle susceptibles d'être apportées par les prémélanoïdines étudiées. Nous avons suivi le développement de chaque microorganisme au biophotomètre. Les résultats du tableau 2 sont exprimés en unités de densité optique (D = 2 — log T) et correspondent à la phase à taux de croissance nul ou phase maximum obtenue généralement après 48 h d'incubation. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais simultanés.

TABLEAU 2

	L. arabinosus	*L. casei*	*L. acidophilus*
Concentration de glucose en mg/ml de milieu			
20	0,69	0,51	0,60
25	0,81	0,60	0,60
30	0,81	0,69	0,69
Concentration de glycocolle en mg/ml de milieu			
0	0,69	0,51	0,60
2	0,69	0,60	0,60
3	0,69	0,59	0,50

Il apparaît donc que le glucose peut avoir un rôle sensiblement limitant, surtout pour *L. arabinosus*, tandis que le glycocolle n'intervient que très peu, seul, aux faibles doses, pour *L. casei*. Pour plus de sûreté, nous avons dû réaliser dans nos essais un témoin particulier recevant les quantités de glucose et de glycocolle apportées par les prémélanoïdines.

b) *Action des différentes prémélanoïdines*

Les préparations étudiées diffèrent entre elles par l'intensité à laquelle la réaction a été poussée : toutes choses égales d'ailleurs, cette intensité de réaction est fonction du temps de chauffage. Nous avons mesuré la production d'acide accumulé et l'opacité du milieu de culture lorsqu'aux milieux de base décrits plus haut, on ajoute une même quantité de diverses préparations de prémélanoïdines.

Les courbes de la *figure 2* montrent, à titre d'exemple, et pour la souche *L. acidophilus*, l'évolution au cours du temps, de l'acidité — exprimée en millimoles d'acide lactique — et de l'opacité exprimée en pourcentage de transmission ; elles se rapportent à des cultures témoins et à des cultures en présence de prémélanoïdines 48 h. Les courbes de croissance présentent dans la partie moyenne une phase exponentielle ; pour comparer les taux de croissance dans cette zone, on calcule la densité

optique (D = 2 — log T), puis, on prend le logarithme dont on représente la variation en fonction du temps. On a alors une relation linéaire entre log D et t.

$D = D_0 2^{\mu t}$ où μ est le taux de croissance : temps de division par unité de temps. $\log D = \log. D_0 + \mu (\log 2) t$. La pente de la partie linéaire est donc proportionnelle à μ, que l'on calcule facilement. D'autre part, l'intersection de la droite avec l'axe des abscisses donne de façon précise le temps de latence. En ce qui concerne les courbes d'acidité, on constate qu'elles sont des droites bien définies dans l'intervalle 10 h-27 h, les vitesses de production d'acide nous sont données directement par la valeur des pentes et le temps de latence peut être approximativement connu par extrapolation ; les valeurs obtenues ne sont pas précises et les variations ne sont significatives que si elles sont importantes. Les tableaux 3 à 8 sont relatifs à des cultures en présence de prémélanoïdines agissant à la concentration maximum c'est-à-dire ajoutées au milieu sans dilution préalable (nous verrons plus loin l'action éventuelle de ces dilutions). Nous y avons rassemblé les résultats obtenus par chacune

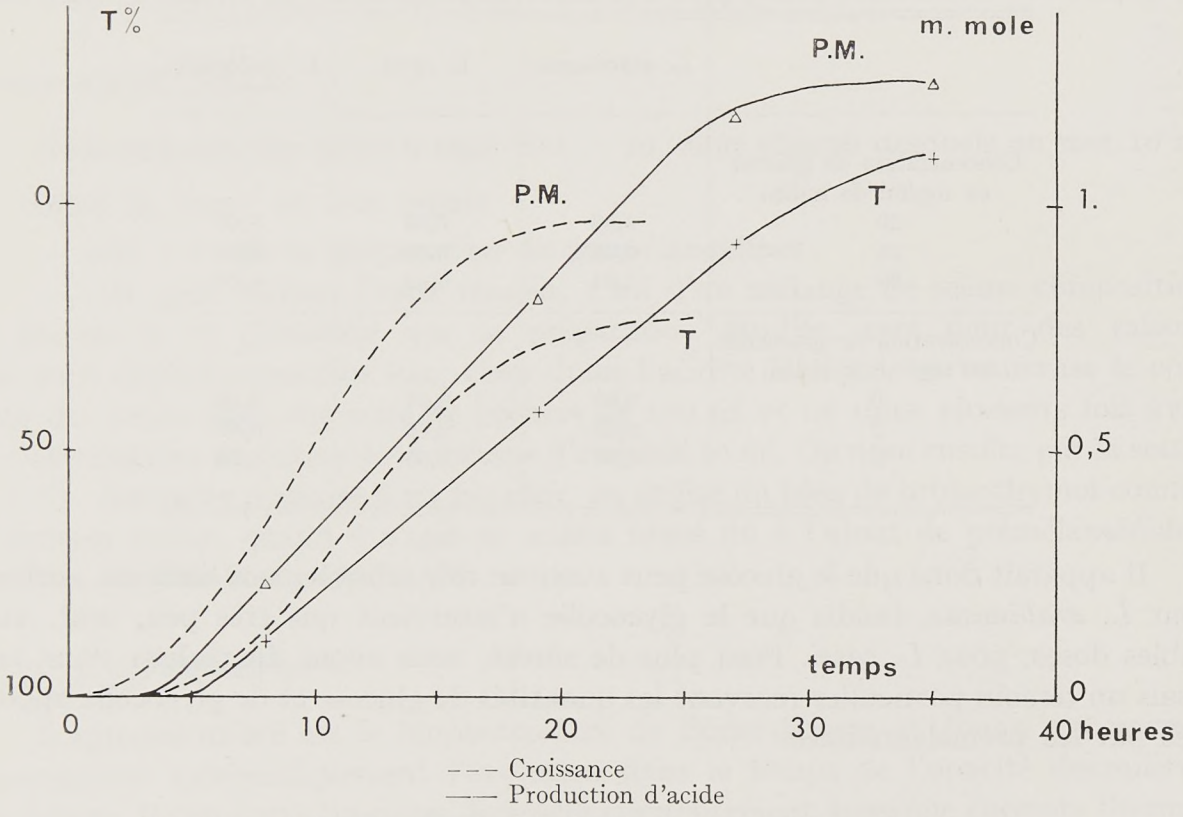


FIG. 2. — *Croissance et production d'acide de* Lactobacillus acidophilus
L'échelle de droite represente l'acidité en millimoles
celle de gauche l'opacité en pourcentage de transmission

des deux méthodes d'observation : t_A, t_C, sont respectivement les temps de latence, en heures, relatifs à la production d'acide et à la croissance ; μ : le nombre de divisions cellulaires par heure ou taux de croissance ; V : vitesse de production d'acide en millimoles par heure, et D_M : la densité optique en fin de croissance. De plus, nous avons fait figurer les valeurs des rapports $\frac{V}{V_T}$ et $\frac{\mu}{\mu_T}$ relatifs soit à la production d'acide, soit aux mesures opacimétriques. Ces rapports sont supérieurs à 1 dans le cas d'une activation, inférieurs à 1 dans le cas d'une inhibition. Chacune des valeurs V et V_T figurant dans ces tableaux est la moyenne de quatre ou six essais.

— *L. arabinosus*

TABLEAU 3

Mesure de l'acidité lactique

Temps de réaction en heures	2		8		24		48	
	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai
t_A	6	5,30	6	5,30	6	5,30	6	5,30
$V \times 10^{-1}$	0,43	0,47	0,42	0,41	0,40	0,39	0,40	0,51
$\frac{V}{V_T}$	1,09		0,97		0,97		1,27	

TABLEAU 4

Mesure de la croissance

Temps de réaction en heures	2		8		24		48	
	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai
t_C	2,30	2,20	2,30	2	2,30	2	2,40	2
D_M	0,70	0,69	0,66	0,69	0,68	0,68	0,69	0,80
μ	1,70	1,76	1,68	1,70	1,70	1,80	1,70	1,85
$\frac{\mu}{\mu_T}$	1,03		1,01		1,05		1,08	

— *L. casei.*

TABLEAU 5

Mesure de l'acidité lactique

Temps de réaction en heures	2		8		24		48	
	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai
t_A	5,30	5	5,30	5	5,30	5	5,30	4,30
$V \times 10^{-1}$	0,28	0,27	0,29	0,30	0,31	0,32	0,27	0,32
$\frac{V}{V_T}$	0,96		1,03		1,03		1,18	

TABLEAU 6

Mesure de la croissance

Temps de réaction en heures	2		8		24		48	
	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai
t_C	3	2,30	3	2,30	3	2	3	2
D_M	0,60	0,60	0,58	0,60	0,60	0,69	0,60	0,76
μ	1,40	1,35	1,45	1,50	1,40	1,55	1,45	1,60
$\frac{\mu}{\mu_T}$	0,96		1,04		1,10		1,10	

— *L. acidophilus.*

TABLEAU 7

Mesure de l'acidité lactique

Temps de réaction en heures	2		8		24		48	
	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai
t_A	5	4,30	5	4,30	5	3,30	5	3,30
$V \times 10^{-1}$	0,40	0,40	0,40	0,42	0,41	0,46	0,42	0,55
$\frac{V}{V_T}$	1,00		1,05		1,12		1,30	

TABLEAU 8

Mesure de la croisssance

Temps de réaction en heures	2		8		24		48	
	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai
t_C	3	3	3	2,30	3	2	3	1
D_M	0,69	0,69	0,68	0,66	0,68	0,69	0,69	1,30
μ	2,55	2,55	2,53	2,58	2,60	2,60	2,60	3,20
$\frac{\mu}{\mu_T}$	1,00		1,02		1,00		1,23	

Pour chacune d'elles, nous avons appliqué les tests d'homogénéité relatifs aux petits échantillons. Il en est résulté que les rapports $\frac{V}{V_T}$ n'avaient de signification à 95 p. 100 que lorsqu'ils étaient supérieurs à 1,10 ou inférieurs à 0,90. Lorsque ce rapport est trouvé égal à 1,20, la différence entre le V et le V_T correspondant est significative à plus de 99 p. 100. Pour les valeurs μ et μ_T, étant donnée la bonne reproductibilité des courbes de croissance obtenues au biophotomètre, on peut attribuer une signification aux résultats au-delà de 95 p. 100.

Voyons d'abord pour chacune des souches examinées la façon dont elle réagit à la présence des prémélanoïdines.

L. arabinosus.

Si nous considérons d'abord la production d'acide lactique, nous constatons que seule la préparation de 48 h nous donne un rapport $\frac{V}{V_T}$ significativement supérieur à 1, c'est-à-dire, traduisant une activation certaine ; en aucun cas, par contre, le temps de latence n'est modifié par rapport au témoin. Les mesures de croissance ne présentent un parallélisme avec les précédentes qu'en ce qui concerne la densité optique du milieu final : seule la préparation de 48 h augmente nettement cette densité optique qui passe de 0,69 à 0,80. Par contre, elles traduisent pour toutes les préparations une action faible, mais constante, sur le temps de latence qui, dans trois cas sur quatre, se trouve abrégé de 20 p. 100 environ.

Étant donné la précision avec laquelle ce temps est déterminé, cette variation est certainement significative. D'une façon générale, donc, on peut conclure que, dans nos conditions expérimentales du moins, *L. arabinosus* ne réagit qu'à la présence de prémélanoïdines correspondant à un temps de chauffage suffisamment prolongé.

L. casei.

Là aussi, la production d'acide lactique n'est significativement affectée que par la préparation de 48 h ; c'est également la seule préparation qui altère sensiblement le temps de latence, le diminuant de 1 h, soit 20 p. 100 par rapport au témoin. Par contre, les courbes de croissance permettent de déceler une influence des prémélanoïdines dès un temps de chauffage de 24 h, puisque, comme pour une préparation de 48 h, nous obtenons un rapport $\frac{\mu}{\mu_T}$ de 1,10, qui s'est avéré reproductible.

De même, la densité optique totale, D_M, est nettement accrue dans la phase stationnaire de croissance, pour les deux mêmes préparations. Là encore, les temps de latence sont nettement diminués.

L. acidophilus.

On constate que la production d'acide lactique est également accélérée par la présence de prémélanoïdines de 24 h et de 48 h. Dès 24 h, apparaissent des composés qui diminuent le temps de latence et tendraient à accélérer la vitesse d'accumulation de l'acide lactique.

Les mesures de croissance traduisent également une influence très favorable de

la préparation de 48 h qui augmente la vitesse de croissance $\frac{\mu}{\mu_T} = 1{,}23$, et aussi la quantité totale des micro organismes formés ; de plus, toutes les préparations tendent à abréger la durée de la phase de latence de plus de 20 p.100.

c) *Influence de la concentration des prémélanoïdines*

Dans les tableaux 9 à 14, nous avons rassemblé les résultats relatifs aux variations $\frac{V}{V_T}$ et $\frac{\mu}{\mu_T}$ en fonction des dilutions de prémélanoïdines. Nous n'avons pas retenu les valeurs des temps de latence, et du taux maximum de croissance qui ne sont significatives que pour *L. acidophilus* aux très faibles dilutions.

L'examen des résultats montre une action activatrice, faible mais reproductible des préparations diluées de prémélanoïdines 2 h — 8 h — 24 h, sur *L. arabinosus* et *L. casei*. Par contre, la préparation 48 h voit son influence diminuer lorsqu'augmente la dilution. Notons aussi, que les souches dont l'activité n'a pas été modifiée par la présence des préparations de prémélanoïdines non diluées ont une tendance à l'activation lorsqu'on ajoute des prémélanoïdines diluées.

— *L. arabinosus.*

TABLEAU 9

Acidité : $\frac{V}{V_T}$

Prémélanoïdines de	Dilutions					
	1	10	10^2	10^3	10^4	∞
2 heures.....	1,09	1,10	1,11	1,03	1,02	1
8 heures.....	0,97	1,06	1,03	1,00	0,98	1
24 heures.....	0,97	1,13	1,16	1,00	1,07	1
48 heures.....	1,27	1,20	1,10	1,04	1,01	1

TABLEAU 10

Croissance : $\frac{\mu}{\mu_T}$

Prémélanoïdines de	Dilutions					
	1	10	10^2	10^3	10^4	∞
2 heures.....	1,03	1,06	1,06	1,03	1,00	1
8 heures.....	1,01	1,01	1,00	1,00	0,98	1
24 heures.....	1,05	1,04	1,03	1,00	1,05	1
48 heures.....	1,08	1,06	1,05	1,00	1,00	1

— *L. casei.*

TABLEAU 11

Acidité : $\frac{V}{V_T}$

Prémélanoïdines de	Dilutions					
	1	10	10^2	10^3	10^4	∞
2 heures.....	0,96	1,00	1,02	1,02	1,03	1
8 heures.....	1,03	1,06	1,00	1,15	1,02	1
24 heures.....	1,10	1,15	1,10	0,96	0,98	1
48 heures.....	1,18	1,17	1,10	1,09	1,04	1

TABLEAU 12

Croissance : $\frac{\mu}{\mu_T}$

Prémélanoïdines de	Dilutions					
	1	10	10^2	10^3	10^4	∞
2 heures.....	0,96	1,02	0,98	1,03	1,00	1
8 heures.....	1,04	1,00	1,10	1,10	1,00	1
24 heures.....	1,10	1,00	1,10	1,00	1,00	1
48 heures.....	1,10	1,10	1,10	1,09	1,00	1

— *L. acidophilus.*

TABLEAU 13

Acidité : $\frac{V}{V_T}$

Prémélanoïdines de	Dilutions					
	1	10	10^2	10^3	10^4	∞
2 heures.....	1,00	1,04	1,04	1,00	1,00	1
8 heures.....	1,05	0,95	1,04	1,05	1,00	1
24 heures.....	1,12	1,10	1,01	1,00	1,00	1
48 heures.....	1,29	1,22	1,14	1,14	1,00	1

TABLEAU 14

Croissance : $\frac{\mu}{\mu_T}$

Prémélanoïdines de	Dilutions					
	1	10	10^2	10^3	10^4	∞
2 heures.....	1,00	1,02	1,00	0,98	1,00	1
8 heures.....	1,02	0,98	1,04	1,00	1,00	1
24 heures.....	1,00	1,00	0,98	1,00	1,00	1
48 heures.....	1,23	1,20	1,20	1,10	1,00	1

B. — FERMENTS CITRIQUES

1° État de la question

La production d'acide citrique par fermentation constitue l'une des bases industrielles de préparation de cet acide. Bien que le terme de fermentation citrique soit ici certainement une expression défectueuse, nous l'utilisons cependant au cours de l'exposé en raison de sa commodité et de son emploi courant dans l'industrie.

Depuis les recherches de WEHMER en1893 (40, 41), il est connu qu'un grand nombre de moisissures ont la possibilité de produire de l'acide citrique à partir de milieux de culture convenables et il est vite apparu que les souches d'*Aspergillus* étaient capables d'en assurer l'obtention avec un bon rendement : de nombreux travaux ont été consacrés au mécanisme de la formation d'acide citrique : différentes théories ont été proposées, mais aucune n'apporte d'explication certaine du phénomène observé.

On admet généralement, d'après les travaux de LEWIS, WEINHOUSE (42),MARTIN (43), RAMAKRISHNAN (44, 45), qu'*Aspergillus niger* utilise surtout le cycle de Krebs pour la biosynthèse de l'acide citrique.

Le schéma ci-dessous, extrait de *Physiology of Fungi*, rappelle le cycle de Krebs et les différentes réactions latérales possibles.

D'après LEWIS et WEINHOUSE (42), l'accumulation des citrates est considérée comme résultant d'un mauvais fonctionnement du cycle, qui se traduit par l'apparition de produits de débordement — *overflow product* —, dont l'acide citrique est un représentant. Il ne peut être question d'étudier ici la fermentation citrique elle-même ; mais, étant donné les difficultés que nous avons rencontrées dès le début de notre travail dans le choix de nos conditions expérimentales, nous allons brièvement passer en revue les principaux paramètres qui conditionnent la production d'acide citrique par les *Aspergillus* étudiés. La plupart des travaux se rapportent à des cultures sur milieux synthétiques ; quelques-uns cependant ont été réalisés en milieu naturel, mélasses de canne et de betteraves.

En ce qui concerne la fermentation en milieu synthétique, les conditions d'obtention d'un bon rendement en acide citrique — par des souches d'*Aspergillus niger* cultivées en surface — ont été précisées en 1917 par CURRIE (47), dont les observations ont été corroborées et complétées par DOELGER et PRESCOTT en 1934 (48). La production d'acide citrique est essentiellement sous la dépendance de la nature des souches et du milieu de conservation, du choix de la source carbonée et de celui des sources minérale et azotée ainsi que des facteurs physiques intervenant au cours de la fermentation.

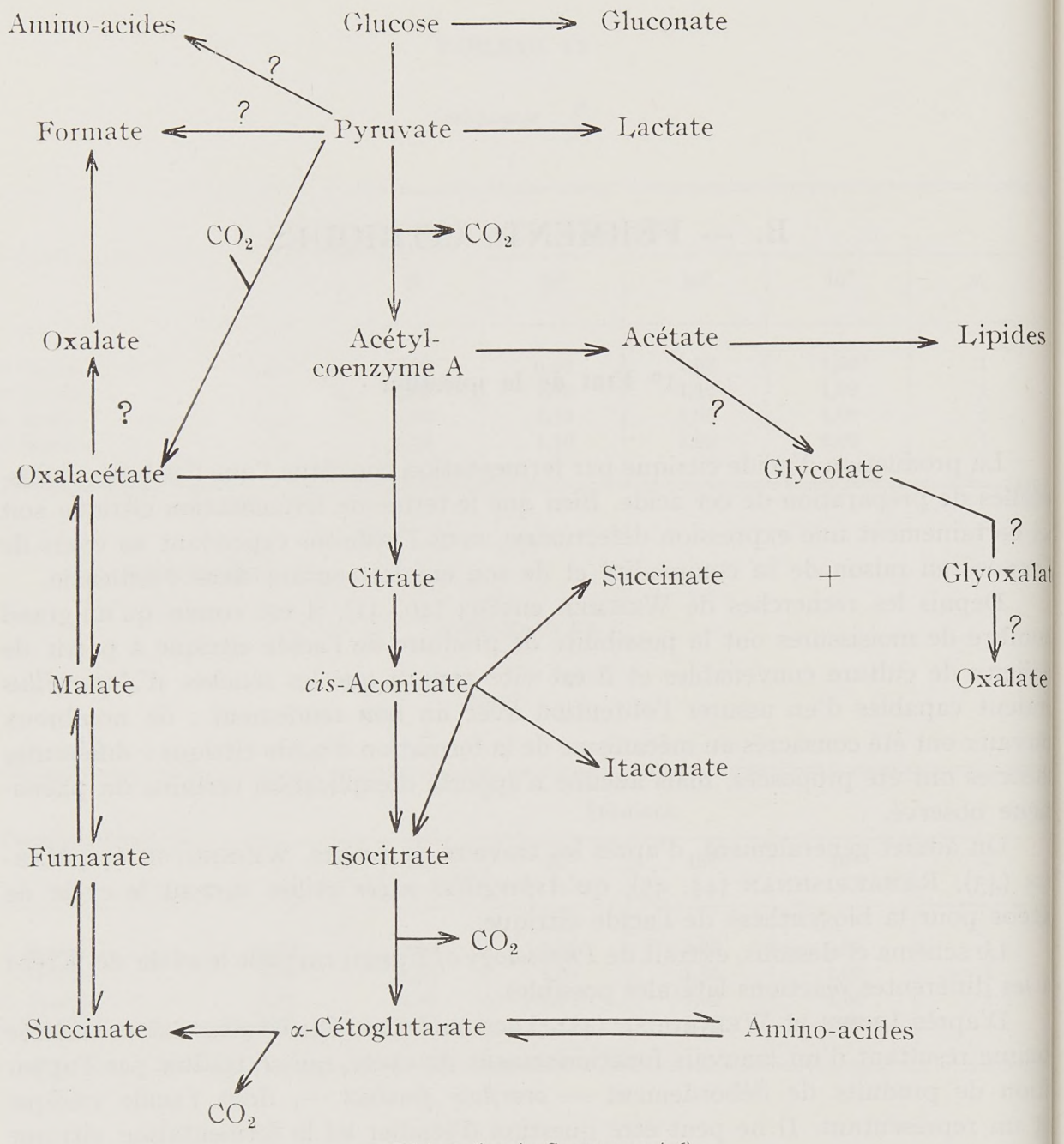


Schéma d'après COCHRANE (46)

a) *Nature des souches et du milieu de conservation*

Parmi les huit souches d'*Aspergillus niger* isolées par DOELGER et PRESCOTT (48) seules quelques-unes se sont montrées capables de produire de l'acide citrique avec un bon rendement ; celui-ci est d'ailleurs tributaire du mode de conservation des souches : ces auteurs préconisent un transfert de spores, à intervalles réguliers, dans un milieu similaire en composition chimique à celui employé pour le milieu de fermentation ; PING SHU et JOHNSON (49), par contre, proposent l'emploi de milieux différents : il faut noter que ces auteurs travaillent en culture submergée et non en culture en surface comme les précédents. PERLMAN (50) observe que les subcultures obtenues par isolement de spores de colonies d'une souche donnée présentent de grandes différences dans leur aptitude à la production d'acide citrique.

b) *Choix de la source carbonée*

Si le glucose peut constituer, dans certains cas, une source carbonée pour *Aspergillus niger* et *A. wentii* et peut donner lieu à de bons rendements en acide citrique, il a été cependant observé que la meilleure source carbonée est le saccharose, utilisé à une concentration de 14 p. 100 (48). DOELGER et PRESCOTT émettent l'hypothèse que l'hydrolyse du saccharose pourrait provoquer une activation de l'un des enzymes intervenant dans la chaîne de réactions conduisant à l'acide citrique, sans préciser davantage le mécanisme du phénomène.

c) *Choix de la source minérale*

Les éléments minéraux qui se sont révélés indispensables sont le potassium, le soufre, le magnésium et le phosphore. Différentes variantes dans la nature et la teneur des sels ont été proposées. Il semblerait que la composition minérale qualitative doive être adaptée à la nature de la souche utilisée et qu'il existe une zone optimum de la concentration en sels minéraux au-delà de laquelle le rendement en acide citrique diminue. D'une manière générale, un bon rendement est obtenu quand le matelas mycélien est mince et la sporulation légère ou quasi absente. L'utilisation de minéraux, autres que ceux mentionnés ne semble pas généralement nécessaire ; on a pourtant prétendu que le fer et le zinc pouvaient accélérer la formation d'acide citrique. Ceci est en désaccord avec les résultats obtenus par D. BERTRAND et A. de WOLF (51) ; ces auteurs trouvent que la carence du milieu en fer et en manganèse entraîne une diminution de la synthèse de l'aconitase, et, par là-même, une accumulation de l'acide citrique. Ces minéraux sont donc, indépendamment l'un de l'autre, nécessaires pour la transformation de l'acide citrique en acide cis-aconitique dans le cycle de Krebs. Dans notre cas, comme BERTRAND et de WOLF, nous avons observé que les sels de fer et de zinc n'augmentent pas le rendement en acide citrique, mais stimulent la croissance ; d'ailleurs, selon QUILICO et DICAPUA (52), l'effet du fer sur la production d'acide citrique par *A. niger* dépendrait de la souche utilisée. C'est aussi l'avis de PERLMAN (50), DORELL et JOHNSON (1946) (53), à la suite d'une étude des effets de l'addition d'ions métalliques sur la production d'acide citrique.

d) *Choix de la source azotée*

A l'exception de certains problèmes de biosynthèse d'amino- acides, le métabolisme azoté des champignons a été relativement peu étudié en profondeur et il n'apparaît pas actuellement possible de tirer une conclusion suffisamment générale des essais effectués en ce domaine. Disons simplement qu'il n'y a pas de schéma d'assimilation azotée susceptible d'être appliqué à tous les champignons et qu'il ne semble pas exister une quantité optimum d'azote pour une culture ; la demande en azote dépendrait surtout de la source de carbone fournie et de l'existence éventuelle de facteurs limitants (STEINBERG et BOWLING, 54).

e) *Choix des facteurs physiques*

Différents auteurs ont étudié l'action sur la fermentation citrique de la température, du pH, du rapport volume/surface, de l'oxygénation. En particulier, DOELGER et PRESCOTT (48) se sont livrés à une étude systématique de ces facteurs ; là encore,

les résultats révèlent que le rendement en acide citrique dépend de la souche utilisée.

La fermentation de l'acide citrique par *Aspergillus niger*, en milieu naturel, à partir de mélasses de canne brute, a été étudiée par PERLMAN, KITA, PETERSON (1946) (55). Ils trouvent que le rendement est médiocre en comparaison de celui obtenu à partir de milieux synthétiques, mais qu'il peut être augmenté et rendu comparable à ce dernier par traitement de la mélasse au ferrocyanure de potassium. Ils concluent donc que ce sont des substances minérales de la mélasse, précipitées au cours de ce traitement, qui sont responsables de l'effet d'inhibition sur la production d'acide citrique.

ROBERTS et MURPHY (56), en 1944, GERHARDT, DORRELL, BALDWIN (57), en 1946, ont étudié la fermentation citrique de mélasses de betteraves par *A. niger*. Là aussi, le traitement préalable de la mélasse par le ferrocyanure de potassium augmente le rendement. D'après CLARK (58), le rendement en acide citrique obtenu à partir de mélasses de betteraves traitées au ferrocyanure de potassium dépend de la concentration du ferrocyanure, des conditions de stérilisation et du pH de la mélasse.

De cet examen général de la question, il ressort d'abord qu'aucune allusion n'a été faite jusqu'alors à une éventuelle action des produits de la réaction de MAILLARD sur le comportement des microorganismes producteurs d'acide citrique. D'autre part, les indications relatives en particulier aux conditions optimales de culture et de conservation des souches, à la nutrition azotée ou minérale, sont, ou bien controversées, ou bien très imprécises ; à tel point qu'on a pu dire que le comportement de chaque souche devait dépendre de conditions susceptibles de varier d'un laboratoire à un autre, en fonction de facteurs impossible à définir (59).

Pour cette raison, nous avons dû étudier, pour chacune des souches que nous avons utilisées, les conditions de culture et d'entretien ainsi que l'influence de l'amino-acide apporté par les prémélanoïdines, avant d'aborder l'examen de l'influence propre de ces dernières.

2° Techniques particulières utilisées

a) *Protocole expérimental*

Inoculum.

On prépare une suspension de spores à partir de nos souches de la façon suivante : les spores de moisissures sont conservées dans la terre de jardin stérile ; au moment de l'utilisation, on fait un isolement sur un milieu convenable, dont la composition s'est révélée en fonction du microorganisme utilisé comme nous le verrons plus loin ; à partir d'une colonie bien isolée sur une boîte de Petri, on fait trois repiquages successifs sur tube incliné et avec le même milieu. Lorsque la tranche du dernier tube repiqué est suffisamment recouverte de spores, on y ajoute une vingtaine de billes de verre stériles de 2 mm de diamètre environ ; après agitation, de manière à les enrober au maximum de spores, on les transvase dans 10 ml d'eau distillée stérile ; on obtient ainsi une suspension de spores relativement homogène, dont on prélève 1 ml pour ensemencer 20 ml de milieu de base.

Stérilisation.

Le milieu de base est stérilisé par filtration à travers une membrane filtrante Millipore type HAWP 0500, de 0,45 μ de diamètre de pore.

Mode opératoire.

Nous utilisons pour nos essais des fioles de 100 ml à fond plat, à large ouverture ; chaque fiole reçoit aseptiquement 20 ml de milieu de base auxquels on ajoute, soit 1 ml de solution de prémélanoïdines à tester, soit 1 ml de solution témoin. Après culture dans l'étuve à 28°C, on apprécie l'état de sporulation du mycélium et on détermine son poids sec ; on dose l'acidité totale, dans certains cas, l'acidité citrique, et on identifie les différents acides accumulés dans le milieu.

b) *Méthodes de dosage*

Poids sec du mycélium.

On recueille le mycélium dans un entonnoir à verre fritté n° 2 monté sur une fiole à vide ; on le lave plusieurs fois à l'eau distillée, on le presse à la main et on le met à sécher dans une capsule tarée, pendant une nuit à l'étuve à 102°C.

Acidité.

Le liquide de lavage du mycélium, récupéré dans la fiole à vide est ajouté au milieu de culture ; le tout est complété à 100 ml. On prélève 20 ml de cette solution, dont on dose l'acidité par la soude (0,1 N) ; on détermine le virage, soit à la phénol-phtaléine pour les jus clairs, soit au pHmètre à pH = 8,3 pour les jus colorés par les prémélanoïdines.

A partir de la même solution, on fait systématiquement une chromatographie monodimensionnelle sur papier d'après la méthode de Cheftel et coll. (60), ceci afin d'identifier qualitativement les différents acides formés au cours de la fermentation. On utilise un solvant monophasique constitué d'acide formique, d'eucalyptol et de propanol, dans les proportions de 20/50/50, auquel on ajoute 50 mg de bleu de bromophénol ; le mélange est additionné d'eau — environ 12 ml — en agitant jusqu'à début de trouble. On laisse déposer à température constante (20°C), et on élimine la phase aqueuse produite par le dépôt du trouble. On dépose des taches de 50 μl sur le papier Whatman n° 1. Le chromatogramme, une fois développé après irrigation descendante de 16 h, est séché dans un endroit assez aéré au moyen d'un petit ventilateur ; en séchant, il passe du jaune au bleu par élimination de l'acide formique, seules apparaissent en jaune les taches correspondant aux acides déplacés.

Nous avons effectué également, mais seulement pour les essais destinés à la recherche d'un milieu de culture convenable pour nos souches, une séparation des acides organiques et, en particulier, de l'acide citrique par chromatographie sur colonne. De cette façon, nous avons pu déterminer un pourcentage précis d'acide citrique par rapport aux autres acides. Nous avons séparé les acides organiques contenus dans le milieu, soit par chromatographie de partage sur colonne de silice, soit par chromatographie sur colonne échangeuse d'anions. La première technique

permet, d'une part, de récupérer l'acide oxalique qui accompagne l'acide citrique quand le métabolisme du ferment se trouve légèrement dévié, d'autre part, de séparer les isomères citriques et isocitriques, fumariques et maléiques. La seconde technique est plus rapide et permet de travailler sur des quantités plus importantes que la première ; de plus, le pic de l'acide citrique, net, n'est pas perturbé par la présence éventuelle des acides minéraux ; par contre, l'acide oxalique n'est pas élué.

— *Chromatographie sur colonne de gel de silice.*

Nous avons utilisé la technique de RAVEUX et BOVÉ (61) que nous rappelons succinctement. On prélève une quantité aliquote de l'échantillon à étudier, contenant au plus 1,5 méq d'acides, on filtre d'abord sur petite colonne (de 12 mm de diamètre et 200 mm de hauteur) remplie de résine Amberlite IRA 400 sous forme carbonate, à laquelle d'après BRUYANT et OVERELL (62) on a fait parcourir deux cycles successifs HCl (N) — CO_3Na_2 (N). Cette résine anionique retient indistinctement tous les acides et laisse filtrer le sucre restant non utilisé par le microorganisme ; après rinçage de la colonne à l'eau, les acides sont élués par 200 ml de carbonate d'ammonium à 5 p. 100. L'éluat est concentré sous vide dans un évaporateur rotatif ; on élimine ainsi le carbonate d'ammoniaque en excès. La dessiccation des sels ammoniacaux des acides est opérée sous vide en présence de potasse en pastilles et d'acide sulfurique concentré. Le résidu est alors dissous dans 0,5 ml de SO_4H_2 (5 N) ; on y ajoute 1 g de SiO_2 anhydre et on agite jusqu'à obtention d'une poudre fine. On développe ensuite soigneusement, et quantitativement, cette poudre sur une colonne contenant 8 g de silice et ayant 12 mm de diamètre et 400 mm de hauteur utile. On élue les acides organiques par action successive de solvant contenant des proportions variables de butanol tertiaire, chloroforme et acide sulfurique (0,5 N) et dont la composition est rappelée ci-après.

Les fractions de 2 ml environ sont recueillies dans des tubes à essai 200 × 20 ; elles sont titrées par la soude $\frac{N}{200}$, en présence de rouge de phénol.

TABLEAU 15

Mélanges	1	2	3	4	5	6	7
Butanol tertiaire	10,4	16,9	22	30,8	38,5	52	25
Chloroforme	119,6	113,1	88	79,2	71,5	78	25
SO_4H_2 (0,5 N)	13	13	11	11	11	13	5
Volume total	130	130	110	110	110	130	55
Volume utile après décantation et élimination de la phase aqueuse.	120	120	100	100	100	120	50

— *Chromatographie sur colonne de résine anionique.*

On fait d'abord passer une partie aliquote de l'échantillon à étudier, contenant au plus 1,5 méq d'acides, sur une colonne de Permutite 50 sous forme H^+ de 12 mm de diamètre et de 180 mm de hauteur. Cette filtration permet de retenir les acides aminés pouvant se trouver dans le milieu ; on rince la colonne à l'eau et ce filtrat passe sur une colonne de résine anionique fortement basique : Dowex 1 × 10-200-400 Mesh, sous forme de formiate de soude ; elle a été préparée en lui faisant parcourir le cycle suivant :

HCOOH (3 N)— eau —, HCl (N) — eau —, HCOONa (N) à pH = 7 ; on ajoute ce dernier jusqu'à élimination totale de Cl^-. Les acides organiques sont élués avec un gradient de concentration en acide formique de 0 à 6 N ; des fractions de 2 ml environ sont collectées dans des fioles coniques de 50 ml. On élimine l'acide formique avant la filtration en évaporant à sec dans une étude à vide à 35°C. On dissout ensuite le résidu avec une solution de rouge de phénol. Les fractions sont titrées, directement dans les fioles avec de la soude $\frac{N}{200}$.

Sporulation.

Faute de technique appropriée, véritablement satisfaisante, nous apprécions visuellement la sporulation. Dans les cas les plus intéressants, quelques reproductions photographiques donneront une idée du phénomène.

3° Résultats expérimentaux

a) *Choix des conditions de travail*

Souches.

Nous avons travaillé sur deux ferments citriques, *Aspergillus wentii* et *Aspergillus niger* ; le premier provient d'une souche utilisée industriellement, le deuxième a été isolé à l'air libre et choisi parmi cinq souches.

Milieu de base.

Nous avons adopté d'abord un milieu de culture selon Currie dont la composition en g est la suivante :

Saccharose	140
NH_4NO_3	2
KH_2PO_4	0,750
$MgSO_4(7H_2O)$	0,200
Eau	1 000 ml

Le pH est ajusté à 3,5 par addition de HCl.

Avec un tel milieu, la quantité totale d'acide produit au cours de la fermentation est faible : 10,2 millimoles dont 6 p. 100 d'acidité non citrique, avec *A. wentii* ; la plus grande partie des acides organiques autres que l'acide citrique s'est montrée constituée par de l'acide oxalique.

A. niger.

TABLEAU 16

	Acidité citrique		Poids sec du mycélium en 10^{-2} g/ml de milieu	Sporulation
	en 10^{-2} mmoles/ml de milieu	en % de l'acidité totale		
SO_4Mg $(7H_2O)$ (g/l)				
0,5	4,1	91	1,01	+++
0,25	6,5	98	1,30	++
0,20	10,2	94	1,25	+
0,10	7	90	0,80	++
PO_4H_2K (g/l)				
1	15	99	1,20	
2	8,3	90	1,40	++
2,5	6,3	91	1,20	+++
3	8	95	1,25	+
NO_3NH_4 (g/l)				
5	6	90	1,30	+++
2,5	10	95	1,00	++
3	16,2	90	1,20	+
1	7,5	91	1,10	+

\+ Mycélium peu sporulé ; ++ Mycélium moyennement sporulé ; +++ Mycélium très sporulé.

A. wentii.

TABLEAU 17

	Acidité citrique		Poids sec du mycélium en 10^{-2} g/ml de milieu	Sporulation
	en 10^{-2} mmoles/ml de milieu	en % de l'acidité totale		
SO_4Mg $(7H_2O)$ (g/l)				
0,5	5	88	1,30	+++
0,25	12	95	1,20	+
0,20	10,5	95	1,00	+
0,10	3	90	0,80	++
PO_4H_2K (g/l)				
1	10	90	0,95	++
2	15	98	1,02	+
2,5	20	99	1,30	++
3	7	89	1,10	++
NO_3NH_4 (g/l)				
5	6	90	1,40	+++
2,5	29	99	1,40	+
3	16	98	1,20	++
1	8	95	1,02	++

\+ Mycélium peu sporulé ; ++ Mycélium moyennement sporulé ; +++ Mycélium très sporulé.

Nous avons alors envisagé d'accroître le rendement en acide citrique en faisant varier la composition du milieu de base par rapport aux constituants réputés essentiels : Mg, PO_4 et NH_4. Partant du milieu de CURRIE (47), nous avons fait varier les teneurs en $MgSO_4$ ($7H_2O$), en PO_4H_2K et en NO_3NH_4, adoptant à chaque fois la concentration optimum qui donne le maximum d'acide citrique.

Nous avons remarqué au cours des expériences que souvent l'augmentation de la production d'acide citrique s'accompagne d'une modification du matelas mycélien qui devient mince et légèrement sporulé. Les tableaux 16 et 17 montrent les résultats relatifs, d'une part, au poids sec du mycélium et à son état de sporulation, d'autre part, à la production d'acide citrique exprimée en millimoles par millilitre de milieu de base et en pourcentage par rapport à l'acidité totale. Les mesures ont été faites dans la zone correspondant à la phase de l'arrêt de la croissance et de la sporulation, soit après 9 à 10 jours d'incubation. Nous avons par ailleurs testé le comportement de deux souches lorsqu'on modifie le pH initial du milieu ; nous l'avons ajusté à pH = 2,3, comme le préconisent DOELGER et PRESCOTT (48).

Nous obtenons les résultats suivants :

A. niger.

TABLEAU 18

pH	Acidité citrique		Poids sec du mycélium en 10^{-2} g/ml de milieu	Sporulation
	en 10^{-2} mmoles/ml de milieu	en % de l'acidité totale		
3,5	16,2	90	1,20	+
2,3	24,2	98	1,20	+

A. wentii.

TABLEAU 19

pH	Acidité citrique		Poids sec du mycélium en 10^{-2} g/ml de milieu	Sporulation
	en 10^{-2} mmoles/ml de milieu	en % de l'acidité totale		
3,5	29	99	1,40	+
2,3	11,2	85	1,25	+++

Il apparaît donc que le pH dépend bien de la nature des souches, ce qui rejoint les résultats de DOELGER et PRESCOTT. *Aspergillus niger* voit sa production en acide citrique augmentée, tandis que celle d'*Aspergillus wentii* se trouve diminuée de plus de 50 p. 100. Les 15 p. 100 d'acidité non citrique sont essentiellement constitués par de l'acide oxalique (photo 1).

Nous avons constaté que contrairement à *A. wentii*, *A. niger* est indifférent à la nature de la source carbonée, du moins lorsque celle-ci est représentée par le glucose ou le saccharose. Dans ces conditions, c'est le glucose que nous avons retenu comme source carbonée pour *A. niger*, pour simplifier l'expérimentation. En effet, lorsqu'au milieu de culture d'*A. wentii* à base de saccharose, en vue du rendement

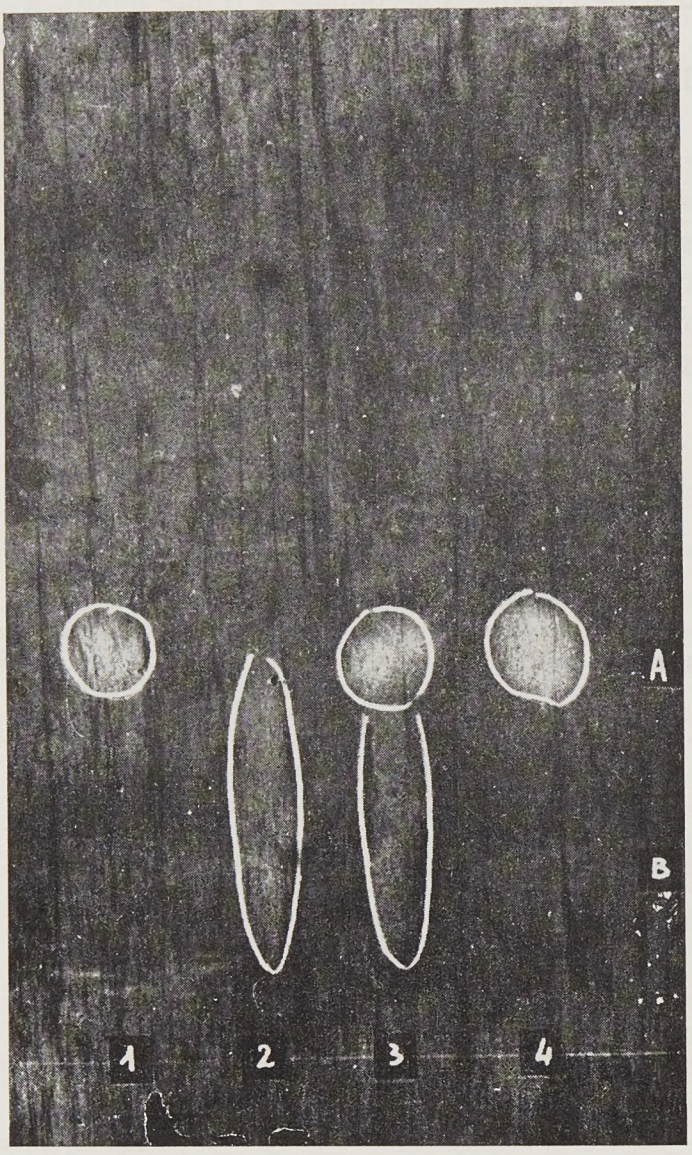


Photo 1. — *Chromatogramme obtenu par la méthode* Cheftel *et coll.*

Échantillon 1 : acide citrique.
Échantillon 2 : acide oxalique.
Échantillon 3 : milieu de culture à pH = 2,3
Échantillon 4 : milieu de culture à pH = 3,5.
(3 et 4 sont relatifs à *Aspergillus wentii*)

A = acide citrique. B = acide oxalique.

optimum, nous ajoutons la prise d'échantillon de prémélanoïdines, nous introduisons une certaine quantité de glucose : or, comme nous l'avons signalé précédemment et comme nous le verrons encore plus loin, celui-ci est capable de modifier la production d'acide citrique. Par contre, si nous choisissons le glucose comme source

carbonée pour *A. niger*, la quantité apportée par le milieu de base représente un tel excès par rapport à celle introduite par les prémélanoïdines que l'influence de ces dernières est négligeable.

Milieu pour *A. niger* (g)		Milieu pour *A. wentii* (g)	
Glucose	140	Saccharose	140
NO_3NH_4	3	NO_3NH_4	2,500
PO_4H_2K	1	PO_4H_2K	2,500
SO_4Mg	0,200	SO_4Mg	0,250
pH amené à 2,3 avec HCl (N)		pH amené à 3,6 avec HCl (N)	
On amène à 1 000 ml avec H_2O		On amène à 1 000 ml avec H_2O	

Milieu de conservation.

En possession de milieux de culture convenables, nous avons été en mesure de tester le milieu de conservation gélosé à partir duquel on prépare la suspension de spores. Nous nous sommes préoccupés de trois milieux de conservation :

— milieu de CZAPECK (C),
— milieu de malt-agar (Difco) (M),
— milieu de composition similaire à celui du milieu de base (S).

A. niger

TABLEAU 20

	Acidité citrique		Poids sec du mycélium en 10^{-2} g/ml de milieu	Sporulation
	en 10^{-2} mmoles/ml de milieu	en % de l'acidité totale		
Milieu C	10	80	0,95	+++
Milieu M	15	99	1,15	++
Milieu S	25	98	1,25	+

A. wentii.

TABLEAU 21

	Acidité citrique		Poids sec du mycélium en 10^{-2} g/ml de milieu	Sporulation
	en 10^{-2} mmoles/ml de milieu	en % de l'acidité totale		
Milieu C	28,5	99	1,45	+
Milieu M	13,2	90	1,10	++
Milieu S	16	95	1,30	++

L'examen des résultats exposés dans les tableaux 20 et 21, toujours relatifs à l'acidité citrique et au poids sec pendant 10 jours d'incubation, montre que le milieu complet de CZAPECK convient mieux à la souche d'*Aspergillus wentii*, tandis que la souche d'*Aspergillus niger* donne de meilleurs résultats avec le milieu de même composition que celui du milieu de culture.

Influence du glucose et du glycocolle.

L'ajout des différentes prémélanoïdines dans le milieu de base, introduit certaines quantités de glucose et de glycocolle, qui, dans nos conditions d'expérience (temps de chauffage compris entre 2 h. et 48 h), varient respectivement de 29,25 mg à 18,75 mg et de 70,20 mg à 30,60 mg (Cf. tabl. 1).

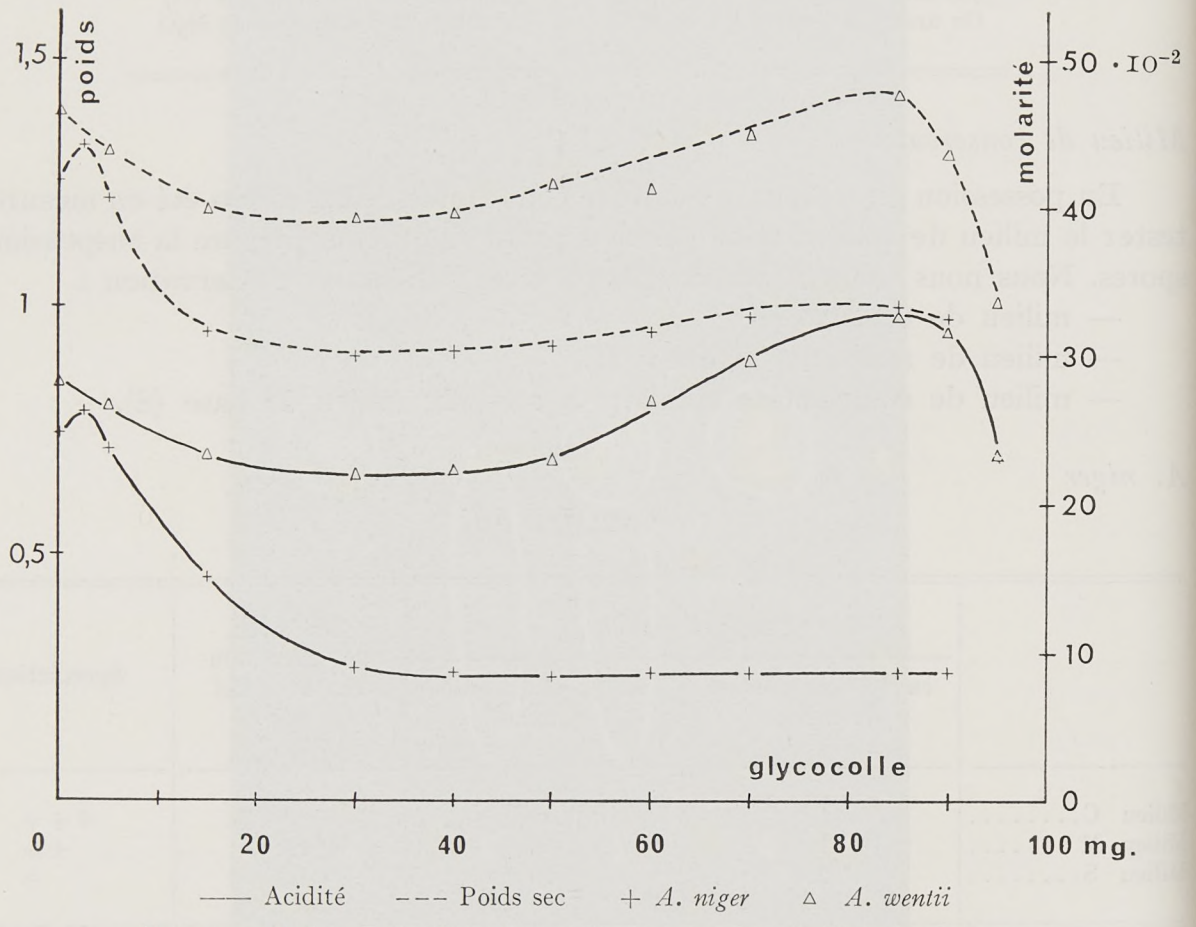


FIG. 3. — *Influence du glycocolle sur les deux souches de ferments citriques*
L'échelle de droite représente l'acidité exprimée en molarité
celle de gauche le poids sec du mycelium exprimé en 10^{-2} g/ml de milieu

Action du glycocolle

Comme nous l'avons signalé antérieurement, l'assimilation azotée et, en particulier, celle des acides aminés par les ferments citriques, est très peu connue ; par ailleurs, le glucose peut occasionnellement, quand il est ajouté à un milieu de base où la source de carbone est le saccharose, modifier le comportement des souches citriques, du moins en ce qui concerne la production d'acide. Pour toutes ces raisons, nous avons été conduits à étudier de façon systématique les répercussions de cet apport de glycocolle sur les deux souches, et de celui de glucose sur *A. wentii*.

Les courbes de la *figure 3* illustrent le comportement des deux souches en pré-

sence de doses variables de glycocolle, allant de 0 à 95 mg ; ainsi les quantités apportées par les prémélanoïdines sont largement encadrées dans la zone étudiée. En ordonnée, nous avons représenté le poids sec du mycélium récolté en grammes par millilitre de milieu de base, ou l'acidité totale en millimoles par millilitre de milieu ; celle-ci est d'ailleurs constituée essentiellement par de l'acide citrique, aucun acide organique autre que ce dernier n'ayant pu être identifié par chromatographie sur papier ; en abscisse, sont portées les quantités de glycocolle en milligrammes ajoutées au milieu de base. Les mesures ont été faites après 10 jours d'incubation à 28°C. Nous voyons que cet acide aminé a des répercussions importantes sur le comportement des deux souches. La production d'acide, par *A. wentii*, se trouve diminuée aux faibles doses, pour atteindre ensuite un maximum à 85 mg de glycocolle. Chez *A. niger*, la dose de 2,5 mg de glycocolle semble activer la production d'acide ; aux plus fortes doses, la production d'acide se trouve fortement diminuée et atteint un palier à partir de 30 mg. La courbe représentative du poids sec du mycélium a la même allure chez les deux souches, sauf pour la valeur de 2,5 mg de glycocolle qui correspond à un maximum pour *A. niger*. Signalons qu'une forte sporulation se manifeste chez *A. niger* à partir de 3 mg de glycocolle introduits dans le milieu de base, alors qu'elle n'apparaît chez la souche industrielle qu'à partir de 60 mg. (photo 2)

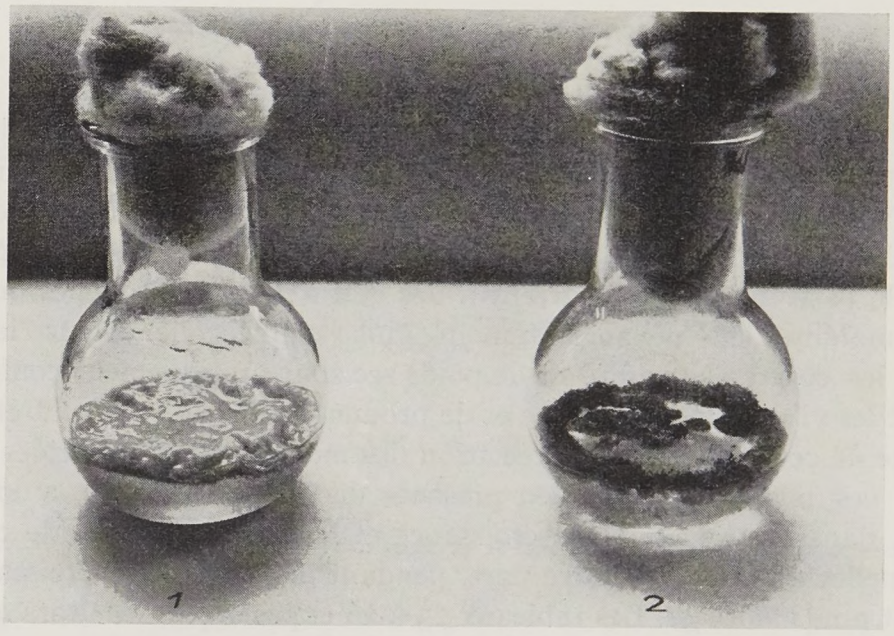


Photo 2. — *Aspergillus niger*

Fiole 1 : Milieu de base sans glycocolle.
Fiole 2 : Milieu de base contenant 3 mg de glycocolle.

Action du glucose.

Nous avons étudié son influence sur *A. wentii* dans la zone correspondant aux quantités de glucose pouvant être éventuellement apportées par les préparations de prémélanoïdines dans le milieu de culture. Nous avons rassemblé les résultats obtenus dans le tableau 22. Les mesures ont été également faites après 10 jours d'incubation.

Nous voyons que les productions d'acide et de mycélium sont peu affectées par la présence du glucose, et que ce dernier aurait une légère tendance à exalter la sporulation.

TABLEAU 22

Glucose en mg	Acidité en 10^{-2} mmoles/ml	Poids en 10^{-2} g/ml	Sporulation
0	28,3	1,30	+
10	27,3	1,26	++
25	25,6	1,23	++
50	25	1,30	++
75	26,6	1,27	++

Il résulte de cette étude de l'influence du glycocolle et du glucose sur les deux souches que, à chaque essai, nous avons dû réaliser un témoin particulier recevant les quantités de glucose et de glycocolle rigoureusement égales à celles introduites ainsi dans les essais par les différentes prémélanoïdines.

b) *Action des différentes prémélanoïdines*

Avant d'exposer les résultats, présisons la forme générale de courbe de croissance et de production d'acide citrique. Les courbes de la *figure 4* montrent, à titre d'exemple, pour les deux souches, l'évolution au cours du temps de l'acidité citrique exprimée en millimoles par millilitre de milieu de base, et celle du poids sec de mycélium récolté, exprimé en grammes par millilitre de milieu de base. Elles se rapportent à des cultures dans lesquelles on n'a ajouté ni prémélanoïdines ni mélange témoin glucose-glycocolle. Dans leurs parties moyennes, les courbes d'acidité et de poids sec sont pratiquement confondues avec une droite : les vitesses de croissance et de production d'acide peuvent être mesurées par la pente de cette droite. L'appréciation des modifications apportées au comportement de ces microorganismes, en présence de prémélanoïdines, a donc été faite, d'une part, dans l'intervalle où la croissance et la production d'acide citrique sont proportionnelles au temps, d'autre part, pendant la phase où la croissance et l'acidité ne sont plus modifiées. Les tableaux 23 à 26 exposent les résultats obtenus avec les différentes prémélanoïdines. Nous y avons porté :

— les vitesses V et U relatives respectivement à la production d'acide et à la croissance pendant la phase linéaire ;

— les valeurs A et P qui sont respectivement les quantités d'acide produit en fin de fermentation, exprimées en 10^{-2} millimoles par millilitre et le poids sec de mycélium récolté en fin de croissance, exprimé en 10^{-2} grammes par millilitre ;

— les valeurs des rapports $\frac{V}{V_T}$ et $\frac{U}{U_T}$ où V est la vitesse de production d'acide, exprimée en 10^{-2} millimoles par millilitre et par jour ; U est la vitesse de production de mycélium, exprimée en 10^{-2} grammes par millilitre et par jour ; V_T et U_T sont les valeurs correspondantes dans l'essai témoin ;

— les valeurs des rapports $\frac{A}{A_T} = r$ et $\frac{P}{P_T} = q$ relatives respectivement à l'acidité développée et au poids de mycélium formé, aux mêmes quantités mesurées dans le milieu de fermentation témoin.

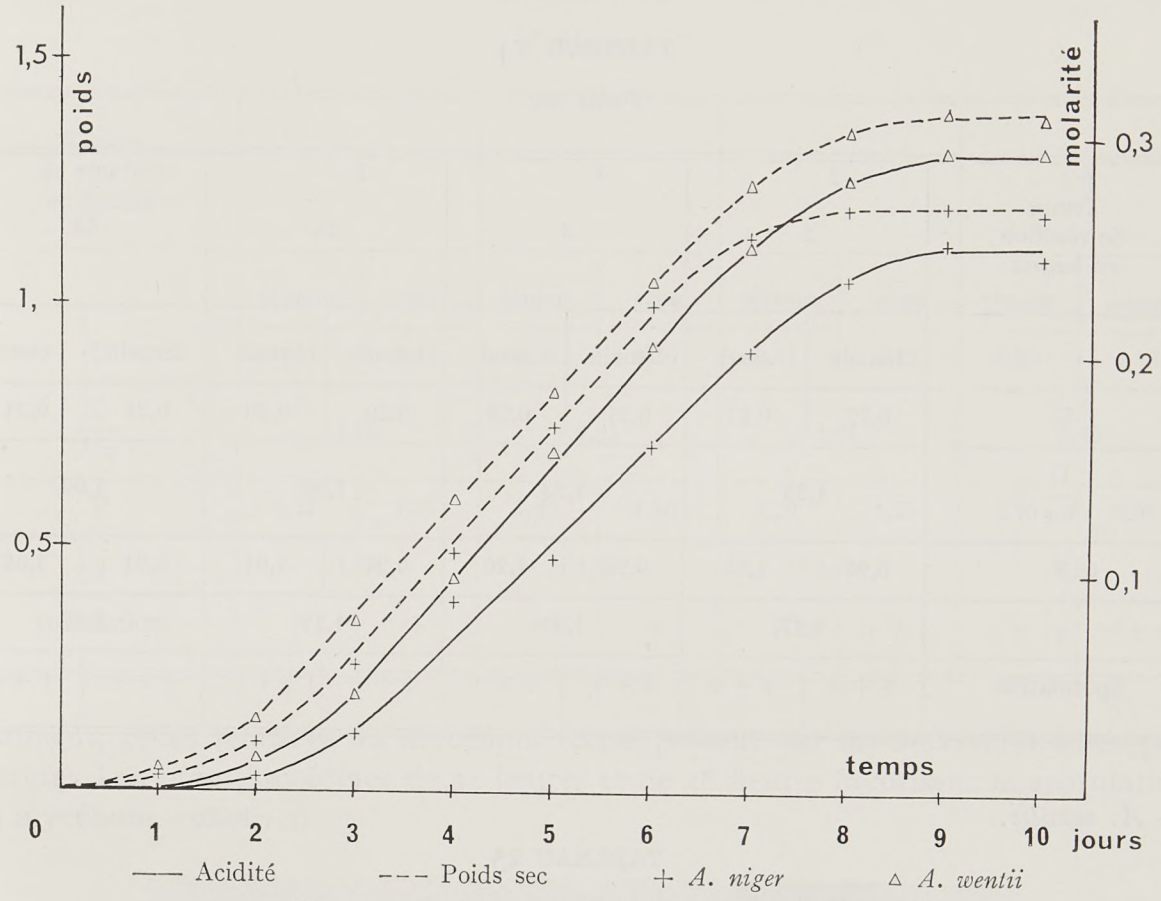


FIG. 4. — *Croissance et production d'acide citrique*
L'échelle de droite représente l'acidité exprimée en molarité
celle de gauche le poids sec en 10^{-2} g/ml

— *A. Niger*

TABLEAU 23

Acidité

Temps de réaction en heures	2		8		24		48	
	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai
V	1,65	1,30	1,70	1,25	2	1,02	2	1
$\frac{V}{V_T}$	0,78		0,73		0,51		0,50	
A	9,9	7,30	9,95	7,10	10,1	6,2	10,2	6
r	0,74		0,71		0,61		0,59	

On constate que :

— pour *A. niger*, les différentes prémélanoïdines ralentissent sensiblement la vitesse de production ou d'accumulation d'acide citrique et ceci dès les premiers stades de la réaction de MAILLARD, puisqu'une préparation de 2 heures a déjà

TABLEAU 24

Poids sec

Temps de réaction en heures	2		8		24		48	
	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai
U	0,22	0,27	0,21	0,28	0,20	0,20	0,21	0,21
$\frac{U}{U_T}$	1,22		1,33		1,00		1,00	
P	0,90	1,15	0,90	1,20	0,91	1,01	0,91	1,02
q	1,27		1,33		1,11		1,12	
Sporulation	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

— *A. wentii.*

TABLEAU 25

Acidité

Temps de réaction en heures	2		8		24		48	
	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai
V	3,83	5,30	3,80	4,50	3,80	3,80	3,85	2,60
$\frac{V}{V_T}$	1,38		1,18		1,00		0,67	
A	24,5	31	24	28	25,6	25,5	26	17
r	1,26		1,07		0,99		0,65	

un effet dépressif net. Par contre, on voit une importante exaltation de la production de mycélium ; cette influence passe d'ailleurs par un maximum en fonction du temps de réaction : une préparation de 8 heures est plus active que celle de 2 heures, celles de 24 heures et de 48 heures n'ont plus d'activité ;

— pour ce qui est d'*A. wentii*, il répond aux prémélanoïdines soit par une activation aux temps de chauffage les plus courts, soit par une inhibition pour les prémélanoïdines de plus longue durée ; alors que les valeurs de l'acidité décroissent cons-

TABLEAU 26

Poids sec

Temps de réaction en heures	2		8		24		48	
	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai
U	0,21	0,22	0,20	0,25	0,21	0,22	0,20	0,18
$\frac{U}{U_T}$	1,04		1,25		1,04		0,90	
P	1,27	1,35	1,20	1,40	1,20	1,25	1,10	0,90
q	1,06		1,17		1,04		0,81	
sporulation	+	+	+	+	+	+++	+	+++

tamment, celles relatives au mycélium formé passent par un maximum assez peu marqué. Les prémélanoïdines de 24 heures et de 48 heures favorisent la sporulation du mycélium. (photo 3).

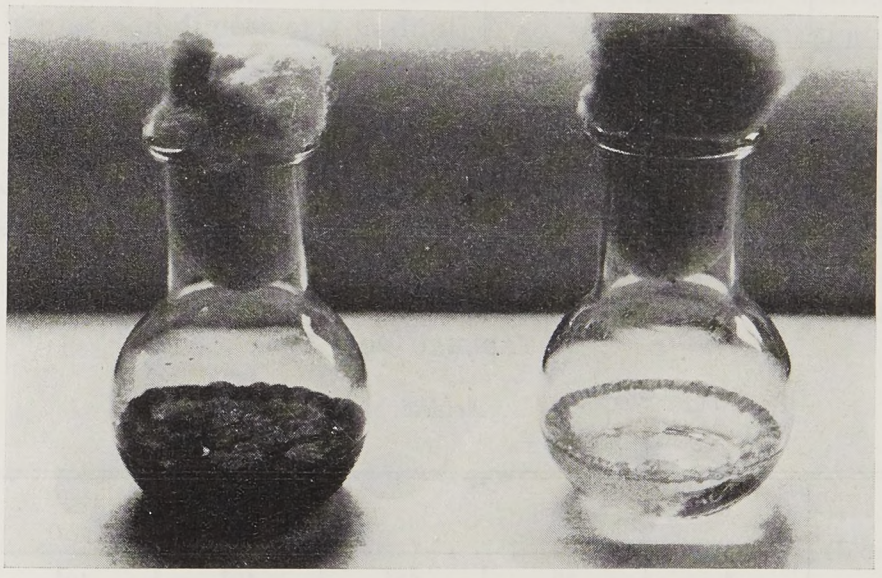


Photo 3. — *Aspergillus wentii après 3 jours d'incubation*
A gauche : La préparation de 48 h favorise la sporulation du mycélium.
A droite : Témoin.

De plus, nous avons remarqué que les prémélanoïdines ne déviaient pas le métabolisme des ferments citriques puisque nous n'avons décelé aucun autre acide organique par chromatographie sur papier, à l'exclusion de l'acide citrique.

c) *Influence de la concentration des prémélanoïdines*

Comme pour les microorganismes précédents, nous avons étudié les possibilités d'action des prémélanoïdines à très faibles doses. Dans les tableaux 27 à 30 sont rassemblés les résultats obtenus. Les grandeurs représentées sur ces tableaux

— *A. niger.*

TABLEAU 27

Acidité

Prémélanoïdines de	Dilutions					
	1	10	10^2	10^3	10^4	∞
2 heures.....	0,74	1,05	1,06	1,20	1,07	1
8 heures.....	0,71	0,90	0,97	1,15	1,22	1
24 heures.....	0,61	0,70	0,85	1,00	1,15	1
48 heures.....	0,59	0,65	0,90	0,95	1,05	1

TABLEAU 28

Poids sec

Prémélanoïdines de	Dilutions					
	1	10	10^2	10^3	10^4	∞
2 heures.....	1,27	1,26	1,22	1,05	1,00	1
8 heures.....	1,33	1,15	1,17	1,08	1,02	1
24 heures.....	1,11	1,10	1,00	1,00	1,00	1
48 heures.....	1,12	1,09	0,97	1,00	1,00	1

— *A. wentii*

TABLEAU 29

Acidité

Prémélanoïdines de	Dilutions					
	1	10	10^2	10^3	10^4	∞
2 heures.....	1,26	1,05	1,06	1,20	1,02	1
8 heures.....	1,07	1,04	1,10	1,23	1,00	1
24 heures.....	0,99	1,15	1,20	1,10	1,05	1
48 heures.....	0,65	0,94	1,12	1,03	1,00	1

sont les valeurs du rapport r et q de l'acidité développée ou du poids sec du mycélium formé, aux mêmes quantités mesurées par le milieu de fermentation témoin. Ayant observé que les rapports d'activité relatifs aux productions globales, varient dans le même sens que ceux relatifs aux vitesses, il nous a été plus facile de faire les mesures seulement dans la zone correspondant à la phase de l'arrêt de la croissance et de la production d'acide.

TABLEAU 30

Poids sec

Prémélanoïdines de	Dilutions					
	1	10	10^2	10^3	10^4	∞
2 heures.....	1,06	0,95	0,90	0,96	1,05	1
8 heures.....	1,17	1,10	1,03	1,00	1,00	1
24 heures.....	1,04	1,00	0,98	1,03	1,03	1
48 heures.....	0,81	1,05	1,06	1,00	1,00	1

On voit que pour *A. niger* la production d'acide citrique, qui est inhibée par les prémélanoïdines à concentration maximum, cède la place à une activation d'environ 20 p. 100 lorsque la solution initiale est diluée 10 000 fois ; c'est le cas surtout des prémélanoïdines à faible temps de chauffage. Inversement, la production de mycélium est surtout favorisée aux concentrations les plus fortes.

Pour *A. wentii*, le rapport r relatif à la production d'acide citrique, toujours supérieur à 1, sauf pour les prémélanoïdines de 24 heures, sans dilution, et, pour celles de 48 heures non diluées et à la dilution 10, passe par un maximum net pour une dilution 1 000 des prémélanoïdines de 24 heures et de 48 heures.

Il est à noter que ces observations sont semblables à celles rapportées par SHEIKH (13) dans le cas des levures.

Le rapport q relatif au poids sec est très peu modifié, la dilution des prémélanoïdines n'affecte pas la production de mycélium.

Deuxième Partie

ACTION DES PRÉMÉLANOÏDINES SUR DIFFÉRENTS ENZYMES

Introduction

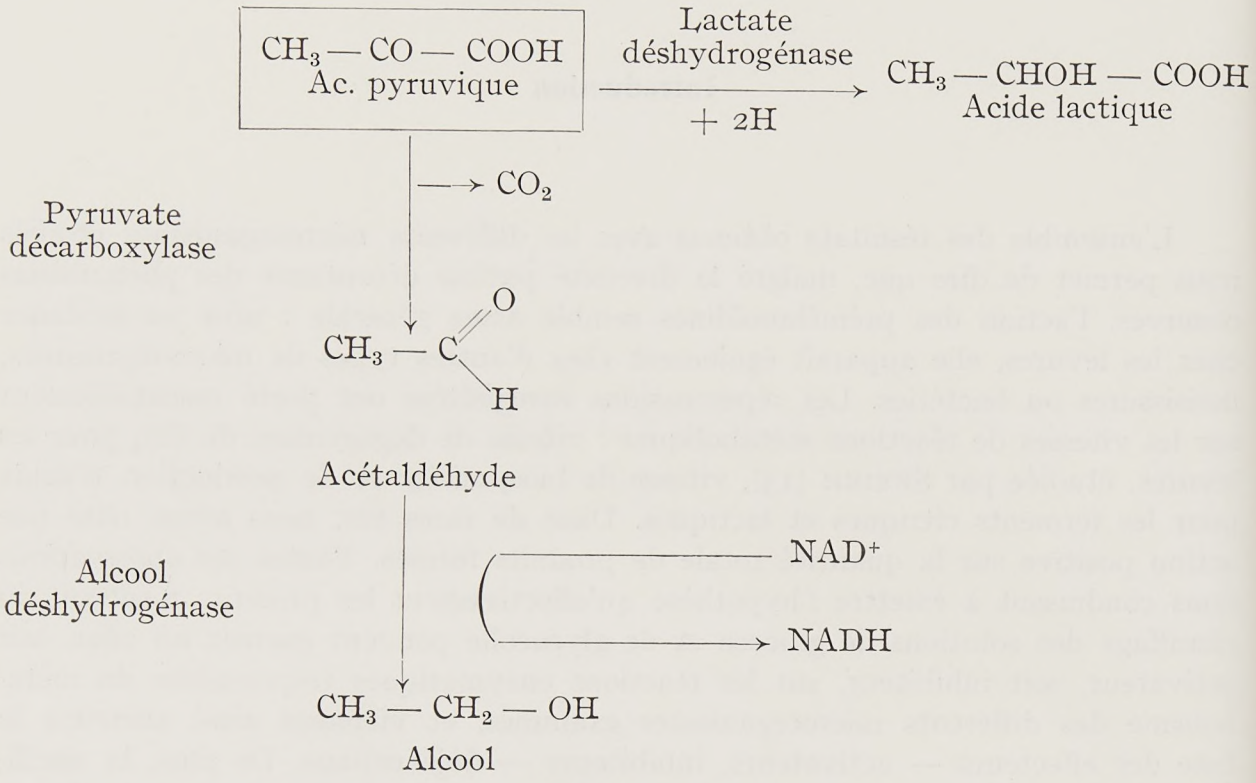
L'ensemble des résultats obtenus avec les différents microorganismes étudiés nous permet de dire que, malgré la diversité parfois déroutante des phénomènes observés, l'action des prémélanoïdines semble assez générale : mise en évidence chez les levures, elle apparaît également chez d'autres types de microorganismes, moisissures ou bactéries. Les répercussions enregistrées ont porté essentiellement sur les vitesses de réactions métaboliques : vitesse de dégagement de CO_2 pour les levures, étudiée par SHEIKH (13), vitesse de biosynthèse et de production d'acide pour les ferments citriques et lactiques. Dans de rares cas, nous avons noté une action positive sur la quantité totale de produits formés. Toutes ces observations nous conduisent à émettre l'hypothèse qu'effectivement les produits résultant du chauffage des solutions de glucose et de glycocolle peuvent exercer un effet, soit activateur, soit inhibiteur, sur les réactions enzymatiques responsables du métabolisme des différents microorganismes examinés, et viennent ainsi accroître la liste des effecteurs — activateurs, inhibiteurs — déjà connus. De plus, la similitude des courbes d'activité *in vivo*, en fonction des dilutions des prémélanoïdines dans le cas de deux microorganismes tels que la levure et les ferments citriques, donne à penser que les prémélanoïdines pourraient agir sur un enzyme intervenant dans une phase commune de la dégradation du glucose ; il est vrai qu'une telle similitude n'a pas été observée chez les trois *Lactobacillus* étudiés, bien qu'il soit admis qu'ils ont le même métabolisme du glucose jusqu'au stade de la formation du pyruvate. C'est ce pyruvate qui a retenu d'abord notre attention, du fait qu'il est un de ces éléments communs, jouissant même d'une position particulière puisqu'il se trouve situé dans la chaîne de réactions au point où bifurquent les voies empruntées par chacun des trois types de fermentation auxquels nous nous sommes intéressés.

Nous nous sommes donc proposé de voir d'abord dans quelle mesure les enzymes admettant pour substrat le pyruvate pourraient être affectés *in vitro* par la présence de prémélanoïdines dans leur milieu de réaction.

Bien sûr, d'autres hypothèses pourraient être tout aussi bien envisagées, en particulier, celle d'une intervention sur les enzymes participant à la glycolyse. Il nous a semblé préférable d'aborder cette question par l'étude des systèmes enzymatiques les plus proches du stade de production des produits terminaux du métabolisme que nous avions dosés.

Nous avons entrepris, en premier lieu, dans cette seconde partie du travail, la séparation et la purification de la pyruvate décarboxylase de la levure, agent responsable du dégagement de CO_2 dans la fermentation. D'autres enzymes, tels

que l'alcool déshydrogénase, la lactate déshydrogénase, agissent en des points situés au voisinage immédiat du point d'intervention de la décarboxylase et ainsi leur activité peut conditionner la vitesse de dégagement de CO_2. De plus, évidemment une activité lactico-déshydrogénasique intervient dans le processus de production d'acide lactique par les ferments lactiques. Pour toutes ces raisons, nous



SCHÉMA

avons été conduits à faire une étude systématique de l'influence des prémélanoïdines sur ces enzymes. Nous nous sommes également proposé d'extraire la pyruvo-décarboxylase oxydative à partir de ferments citriques, et de tester son comportement en présence de prémélanoïdines, puisque cet enzyme régit la décarboxylation oxydative de l'acide pyruvique en acide acétique engagé partiellement dans l'acétyl coA initiateur du cycle de KREBS (Cf. schéma, p. 36).

1° La pyruvate décarboxylase (E. C. : 1. 1. 1. 2)

a) *Préparation*

Nous avons utilisé la méthode de GREEN (63), appliquée d'abord à la levure de brasserie, selon la technique initiale, que nous rappelons brièvement :

La levure de bière est lavée plusieurs fois à l'eau, essorée et mise à sécher sous ventilation à température ambiante (20°C).

— A 100 g de levure, on ajoute 300 ml de tampon phosphate M/15 à pH = 7,2 ; on agite jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène, on laisse autolyser pendant 1 heure à l'étuve, à 37°C. On ajoute ensuite 400 ml d'eau distillée. Après centrifugation, on obtient un extrait total A (530 ml).

— On ajoute à cet extrait 80 ml de tampon phosphate 0,5 M, à pH = 7,2 et 40 ml d'acétate de calcium (1 M) ; il se forme un précipité abondant que l'on sépare par centrifugation. On récupère le surnageant et on complète son volume à 700 ml avec l'eau de lavage du précipité.

— A cette solution, on ajoute 266 g de sulfate d'ammonium (38 g par 100 ml de solution). Le précipité récupéré après centrifugation est dissous dans 300 ml de tampon citrate (0,04 M), à pH = 6.

— La solution obtenue est soumise à une précipitation dans les mêmes conditions que précédemment : on ajoute 114 g de sulfate d'ammonium (38 g par 100 ml de solution). Le précipité est séparé par centrifugation, puis redissous dans 126 ml de même tampon citrate (0,04 M), à pH = 6.

— Cette solution (162 ml) est environ à 11 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium. On lui fait subir une série de précipitations fractionnées ; le degré de saturation est réalisé à chaque stade figurant au tableau ci-dessous qui reproduit les données essentielles du travail de GREEN.

TABLEAU 31

Opérations	Degré de saturation
I	0,35
II	0,42
III	0,52
III*a*	0,47
III*b*	0,52
IIIb_1	0,47
IIIb_2	0,53

Les précipités I et II sont éliminés : le précipité III, résultat d'une précipitation en milieu à 52 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium est redissous dans 200 ml de tampon citrate (0,05 M), pH = 6, au quart de saturation en sulfate d'ammonium ; on rejette le précipité III*a*, et on garde III*b* qu'on reprend avec 200 ml de tampon citrate (0,05 M), pH = 6, au quart de saturation en sulfate d'ammonium. La solution est fractionnée de nouveau ; on garde IIIb_2 où se trouve concentrée notamment l'activité décarboxylasique.

GREEN chiffre l'efficacité de la purification par la valeur du rapport :

$$R = \frac{\text{Densité optique à 280 m}\mu}{\text{Activité décarboxylasique (exprimée en unités décarboxylase/ml)}}.$$

Cette unité décarboxylase est définie comme la quantité d'enzyme qui catalyse la production de 100 µl de CO_2 en 3 minutes, à 30°C. Nous décrirons plus loin le protocole expérimental détaillé. A titre d'exemple, la valeur de R est de 13 pour la fraction 1 et de 0,78 pour la fraction IIIb_2.

Nous avons appliqué cette technique à l'extraction de la pyruvate décarboxylase de la levure de boulangerie. Les fractions obtenues à partir de précipitations fractionnées nous donnaient les rapports d'activité suivants :

TABLEAU 32

Opérations	Degré de saturation	R
I	0,35	15,80
II	0,42	1,20
III	0,52	2,70
III*a*	0,47	2,00
III*b*	0,52	2,30
IIIb_1	0,47	1,80
IIIb_2	0,53	pas de précipité

Nous voyons donc que, contrairement à la levure de bière, où la décarboxylase se trouve concentrée dans la fraction précipitable à 52 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium, celle de la levure de boulangerie se trouve concentrée dans la fraction précipitant à 42 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium. De plus, on n'obtient plus de précipité à la fraction IIIb_2 ; nous avons alors recherché les conditions optimales de fractionnement valables pour la décarboxylase de la levure de boulangerie. Les degrés de saturation utilisés pour les précipitations fractionnées se trouvent rassemblés dans le tableau ci-dessous où nous avons également fait figurer les rapports d'activité relatifs à chaque fraction.

TABLEAU 33

Opérations	Degré de saturation	R
I	0,35	15,80
II	0,42	1,20
II*a*	0,37	2,10
II*b*	0,42	0,80
IIa_1	0,35	1,25
IIb_1	0,42	0,68

Là encore, nous voyons que le critère de pureté passe de 15,80 (pour la fraction I) à 0,68 (pour II b_1).

b) *Dosage d'activité*

Deux techniques de dosage peuvent être utilisées, l'une basée sur la mesure de la vitesse de dégagement de CO_2, l'autre sur le dosage de l'acétaldéhyde.

Dégagement de CO_2.

On détermine directement la cinétique de dégagement de CO_2 au micro-Warburg par action de l'extrait enzymatique sur une solution de pyruvate de sodium. L'extrait utilisé est préalablement dilué de façon telle que l'on se trouve dans des conditions où la quantité d'enzyme est le facteur limitant de la réaction ; ceci est réalisé lorsqu'on est en présence de 0,5 unité décarboxylase provoquant un dégagement de 50 µl en 3 minutes. La quantité de pyruvate utilisée doit être suffisante pour que l'enzyme soit saturé.

On introduit dans la fiole :

0,3 ml de tampon citrate 0,5 M, pH = 6 ;
0,7 ml d'extrait enzymatique ;
0,5 ml d'eau distillée ;
0,5 ml de prémélanoïdines ou de témoin glucose-glycocolle ;

et, dans le diverticule :

0,5 ml de pyruvate de sodium 1 M.

Après mise en équilibre à 30°C, on mélange le contenu du diverticule à celui de la fiole et l'on fait des lectures toutes les dix minutes.

Dosage de l'acétaldéhyde.

Il est basé sur le fait que l'acétaldéhyde résultant de la décarboxylation du pyruvate est réduit en éthanol, en présence d'alcool déshydrogénase dont le co-enzyme à la nicotinamide, NADH, est oxydé en NAD^+. On a suivi cette oxydation au spectrophotomètre Spectronic 505, à 340 mµ. Dans notre cas, nous n'avons pas eu à ajouter d'alcool déshydrogénase dans l'extrait enzymatique car, à côté de la pyruvate décarboxylase, se trouve — quelque soit le degré de pureté de celle-ci — une activité alcool déshydrogénasique suffisamment importante.

Les conditions de dosage sont les suivantes :

1 ml d'extrait enzymatique ;
0,2 ml de pyruvate de sodium 1 M ;
0,5 ml d'eau distillée ;
0,2 ml de NADH $0{,}15 \times 10^{-2}$ M, soit 92 mg/100 ml d'eau ;
1 ml de prémélanoïdines ou de témoin glucose-glycocolle.

Nous n'avons pu expérimenter qu'avec des préparations à temps de chauffage court, ou à des dilutions très fortes de préparations plus poussées en raison de l'absorption intense de ces composés dans le visible et surtout dans l'UV.

c) *Action des prémélanoïdines*

Nous avons étudié l'action des prémélanoïdines aux deux stades extrêmes de la préparation de cet enzyme : dans l'extrait initial A et dans le précipité II b_1 redissous dans un tampon citrate à pH = 6. Le tableau 34 expose les résultats obtenus

avec les différentes prémélanoïdines. Nous y avons représenté les valeurs de $\frac{V}{V_T}$ où V est la vitesse de dégagement du CO_2 en µl par minute et V_T la vitesse du témoin exprimée dans les mêmes unités.

TABLEAU 34

Prémélanoïdines de		2 h	8 h	24 h	48 h
$\frac{V}{V_T}$	Extrait initial	1,15	1,25	1,40	1,50
	Extrait IIb_1	1,08	1,12	1,15	1,20

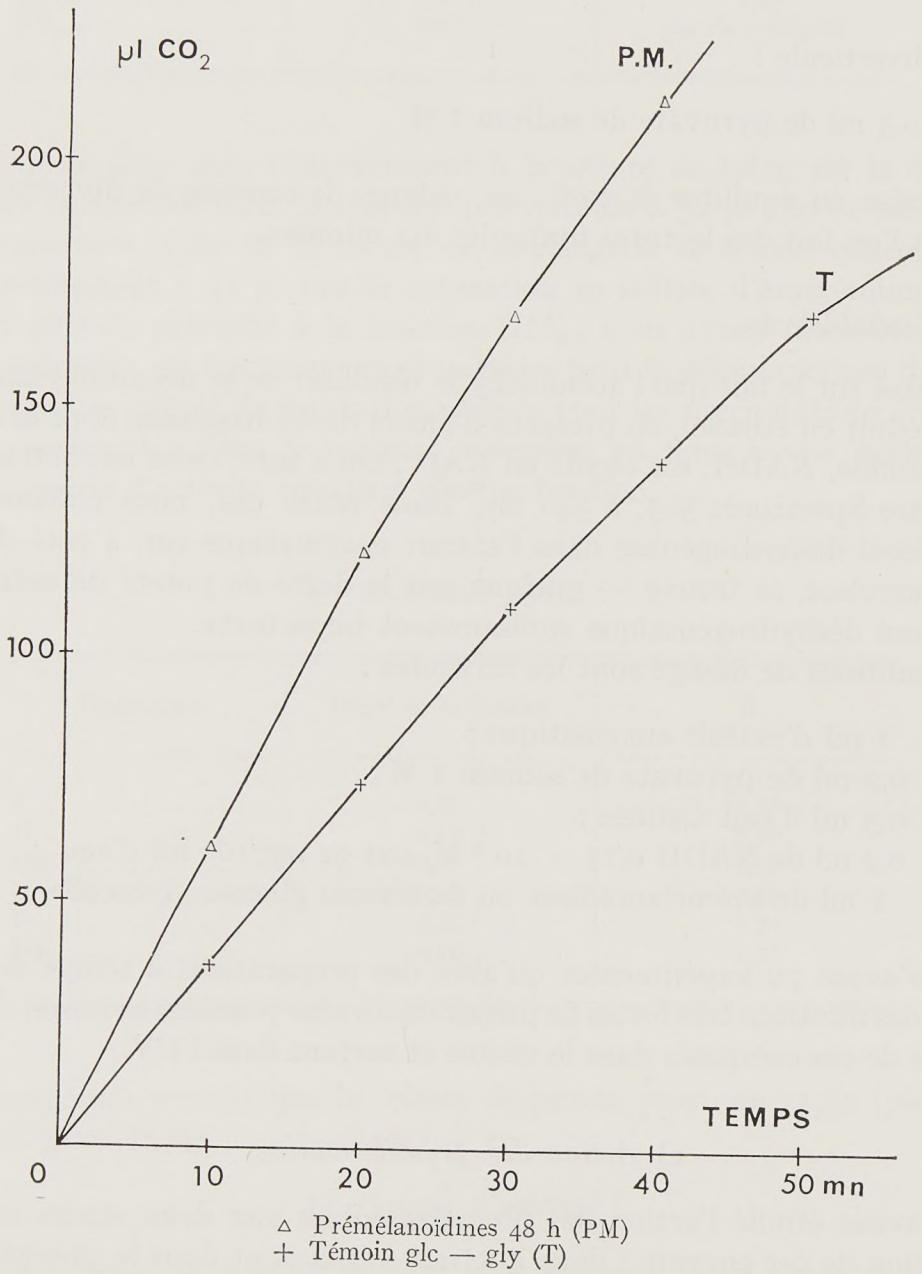


FIG. 5. — *Action de la préparation de prémélanoïdines 48 h sur la pyruvate décarboxylase*

Les courbes de la *figure 5* montrent l'allure de la décarboxylation témoin et celle de la décarboxylation en présence de prémélanoïdines 48 h avec l'extrait initial A.

Deux constatations s'imposent :

— d'une part, les prémélanoïdines sont nettement activatrices, et les effets signalés sont proportionnels au temps de chauffage de celles-ci ;

— d'autre part, l'influence des prémélanoïdines va en diminuant avec le degré de purification de la pyruvate décarboxylase.

d) *Action des concentrations de prémélanoïdines*

Nous avons cherché à préciser les limites de concentration au-delà desquelles les prémélanoïdines n'ont plus d'influence. Dans les tableaux 35 et 36, nous avons fait figurer les valeurs des rapports $\frac{V}{V_T}$ en fonction des dilutions de prémélanoïdines agissant sur les extraits A et II b_1.

TABLEAU 35

Extrait A

Prémélanoïdines de	Dilutions					
	1	2	10	10^2	10^3	∞
2 heures.....	1,15	1,15	1,10	1,03	1,00	1,00
8 heures.....	1,25	1,25	1,21	1,08	1,05	1,00
24 heures.....	1,40	1,40	1,30	1,15	1,07	1,00
48 heures.....	1,50	1,50	1,32	1,20	1,12	1,00

TABLEAU 36

Extrait IIb_1

Prémélanoïdines de	Dilutions					
	1	2	10	10^2	10^3	∞
2 heures.....	1,08	1,08	1,05	1,00	1,00	1,00
8 heures.....	1,12	1,12	1,10	1,06	1,00	1,00
24 heures.....	1,15	1,15	1,13	1,09	1,03	1,00
48 heures.....	1,20	1,20	1,15	1,11	1,08	1,00

On constate que l'activation de la pyruvate décarboxylase varie dans le même sens que les concentrations des prémélanoïdines au-delà de la dilution 2.

Nous avons cherché à voir si les cinétiques d'action enzymatique, avec et sans prémélanoïdines, suivaient ou non la loi simple de HENRI et MICHAELIS (64, 65). Pour cela, on fait varier la concentration en pyruvate, toutes choses étant égales

d'ailleurs, et pour chaque concentration de ce substrat, on relève les courbes représentant les quantités de CO_2 dégagées en fonction du temps ; on mesure les vitesses initiales et, selon la représentation de LINEWEAVER-BURK (66), on trace la variation de $\frac{1}{V}$ en fonction de $\frac{1}{S}$ (V = vitesse initiale et S = concentration en substrat). Si la combinaison enzyme-substrat suit la loi de HENRI et MICHAELIS, on obtient ainsi une droite dont l'ordonnée à l'origine $\left(\frac{1}{V_M}\right)$ et la pente α permettent de calculer la constante de MICHAELIS, ... $K = \alpha V_M$; on sait que l'affinité est chiffrée par l'inverse de cette constante.

Les courbes 6 montrent ce qu'il en est, sans addition de prémélanoïdines, pour la décarboxylase non purifiée et la décarboxylase récupérée, après précipitation fractionnée : la première ne suit pas la loi de HENRI et MICHAELIS, la seconde agit selon le schéma classique. La purification de l'extrait initial entraîne donc la perte des anomalies cinétiques de l'enzyme. Deux explications peuvent en être données

— l'allure de la courbe obtenue avec l'enzyme natif dans la représentation de LINEWEAVER-BURK (66) constitue une propriété intrinsèque de l'enzyme ; dans ces conditions le traitement qu'on lui a fait subir a modifié profondément son comportement cinétique ;

— cette forme exceptionnelle de courbe est la conséquence de la présence de corps étrangers, activateurs ou inhibiteurs, à côté de l'enzyme.

Nous avons étudié l'influence des différentes prémélanoïdines sur la cinétique d'action enzymatique, et calculé chaque fois qu'il a été possible la valeur de K_m correspondante. Le tableau 37 expose les résultats obtenus avec les deux extraits enzymatiques (A et IIb_1).

TABLEAU 37

Valeurs de Km exprimées en moles

Prémélanoïdines de	2 h	8 h	24 h	48 h
Extrait A	$15 \cdot 10^{-8}$	$10{,}3 \cdot 10^{-8}$	$6{,}5 \cdot 10^{-8}$	$5{,}2 \cdot 10^{-8}$
Extrait II b_1	$4{,}5 \cdot 10^{-8}$	$4{,}1 \cdot 10^{-8}$	$3{,}9 \cdot 10^{-8}$	$3{,}8 \cdot 10^{-8}$

La présence de prémélanoïdines dans le milieu de réaction entraîne donc les modifications suivantes :

— L'extrait enzymatique non purifié suit la loi de HENRI et MICHAELIS : dans la *figure 6*, nous avons représenté la droite obtenue avec les prémélanoïdines 48 h. Les valeurs de K_m sont d'autant plus faibles que le temps de préparation des prémélanoïdines est plus long.

— Avec l'extrait enzymatique purifié, les variations de K_m sont moins nettes : la valeur de K_m initialement égale à $4{,}7 \cdot 10^{-8}$ M (sans prémélanoïdines) se trouve réduite à la valeur de $3{,}8 \cdot 10^{-8}$ M en présence de la préparation la plus active, 48 h.

e) *Hypothèses et Vérifications*

Pour expliquer le mécanisme d'action des prémélanoïdines sur la pyruvate décarboxylase, nous avons examiné plusieurs hypothèses de travail.

On sait que l'acétaldéhyde, qui est un inhibiteur de la décarboxylase, a un groupement carbonyle très réactif ; aussi, avons-nous pensé qu'il serait susceptible de se combiner à d'autres composés présents dans les prémélanoïdines : dans ces conditions, son action inhibitrice serait stoppée, et en même temps son spectre d'absorption se trouverait modifié. Nous avons donc relevé d'une part le spectre

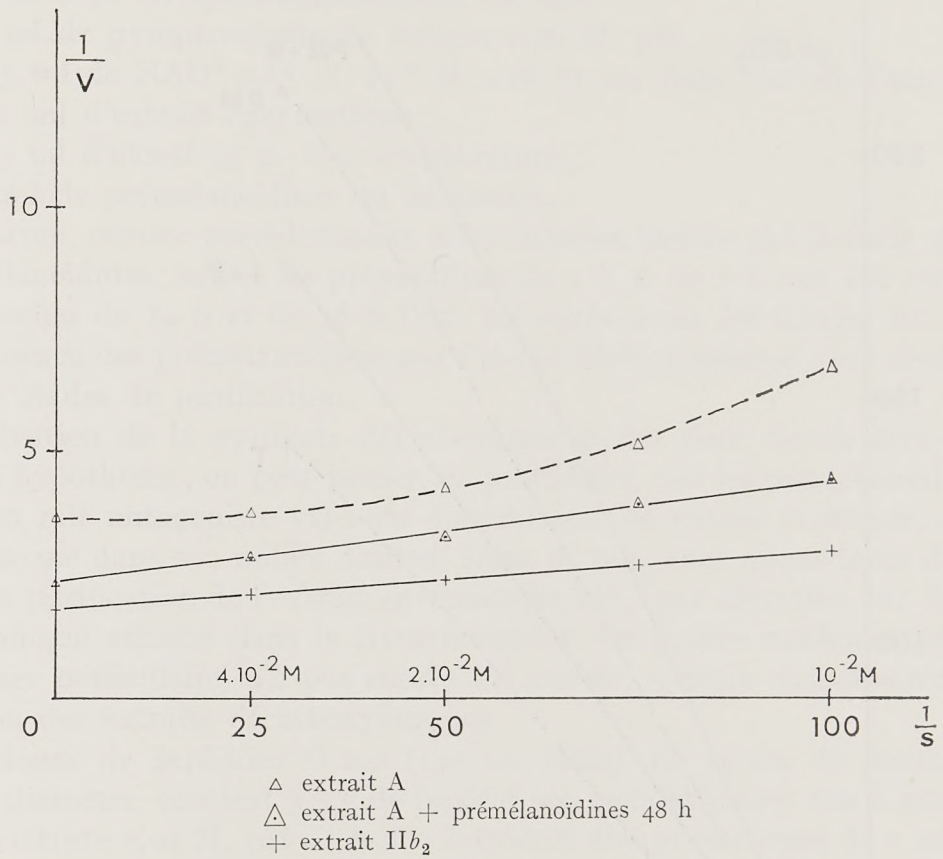


FIG. 6. — *Cinétique d'action de la pyruvate décarboxylase*

d'absorption entre 230 et 340 mμ d'une solution pure d'acétaldéhyde (Max. à 277 mμ) et d'autre part, le spectre d'une solution à la même concentration finale en acétaldéhyde et dans laquelle on a ajouté 1 ml d'une préparation de prémélanoïdines diluée. Pour compenser l'absorption des produits de la réaction de MAILLARD, nous avons mis la même quantité de prémélanoïdines dans la cuve de référence. On constate que les deux spectres se superposent ; l'existence d'un composé d'addition entre acétaldéhyde et prémélanoïdines est donc peu vraisemblable. Il est vrai que nous avons été obligés d'expérimenter sur des dilutions importantes de prémélanoïdines, et, qu'à ces dilutions, la pyruvate décarboxylase est peu activée. De plus, si les prémélanoïdines jouent effectivement le rôle d'anti-inhibiteurs vis-à-vis de l'acétaldéhyde, il suffirait de fixer ce dernier pour lever l'inhibition, et l'action des prémélanoïdines deviendrait

donc nulle. Nous avons neutralisé l'action de l'acétaldéhyde par une solution de bisulfite de sodium (0,5 M).

Les essais réalisés peuvent être schématisés ainsi :

I Substrat + Enzyme.
II Substrat + Enzyme + Bisulfite (B).
III Substrat + Enzyme + Prémélanoïdines (PM).
IV Substrat + Enzyme + Prémélanoïdines (PM) + Bisulfite.

Les courbes de la *figure 7* montrent les résultats obtenus :

— Le bisulfite améliore, sans aucun doute, l'activité décarboxylasique, en bloquant l'acétaldéhyde au cours de sa formation.

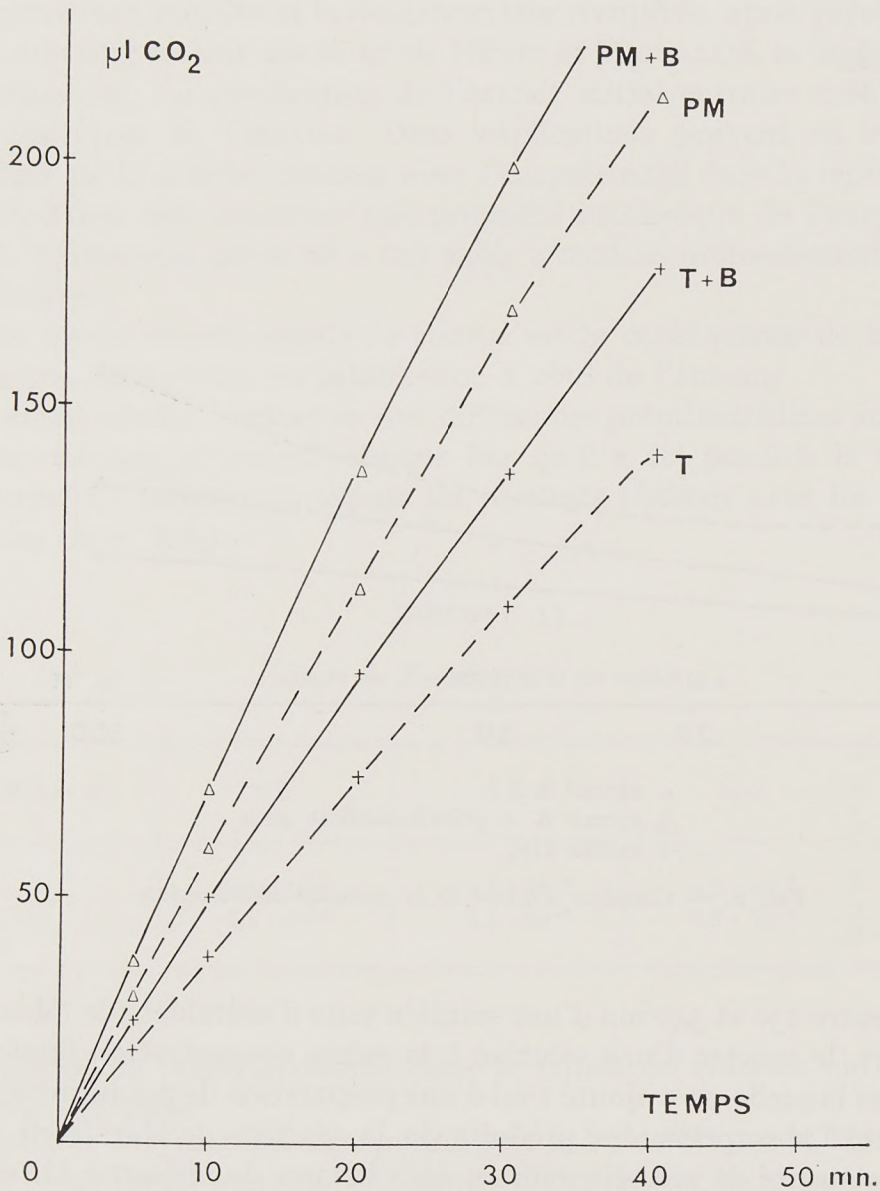


FIG. 7. — *Action du bisulfite et des prémélanoïdines sur l'activité de la pyruvate décarboxylase*

— L'influence des prémélanoïdines n'est pas modifiée par la présence du bisulfite.

Il ressort de ces observations que les prémélanoïdines ont une action vraisemblablement indépendante de l'acétaldéhyde accumulé au cours de la réaction.

Dans le même esprit on aurait pu penser que les prémélanoïdines intervenaient en activant la déshydrogénase alcoolique qui aurait alors réduit plus rapidement l'acétaldéhyde. Nous avons alors regardé dans quelles mesures l'activité de l'alcool déshydrogénase se trouve affectée par la présence de produits de la réaction de MAILLARD. Nous avons expérimenté sur trois extraits enzymatiques : l'extrait initial A, l'extrait IIb_1 contenant suffisamment d'alcool déshydrogénase, et une préparation commerciale (Sigma, n° 340-26).

Le dosage repose sur le fait que l'oxydation de l'alcool éthylique en acétaldéhyde s'accompagne d'une réduction du NAD^+ en NADH. Nous avons suivi cette réduction à 340 mμ.

Les conditions d'expérience sont les suivantes :

Dans la cuve du spectrophotomètre, on met :

— 1 ml de pyrophosphate de sodium 0,06 M, pH = 8,5 ;

— 0,5 ml de NAD^+ $0{,}15 \times 10^{-2}$ M, soit 91 mg dans 100 ml d'eau distillée ;

— 0,2 ml d'extrait enzymatique ;

— 0,3 ml d'alcool 95 p. 100 non dénaturé ;

— 1 ml de prémélanoïdines ou de témoin.

Là encore, comme précédemment, nous sommes limités par la forte absorption des prémélanoïdines ; seules les préparations de 2 h et de 8 h ont été testées sans dilution ; celles de 24 h et de 48 h l'ont été après avoir été diluées 100 fois.

L'influence des prémélanoïdines sur l'alcool déshydrogénase s'est révélée nulle, à tous les stades de purification.

L'activation de la pyruvate décarboxylase paraît donc devoir être rattachée à d'autres hypothèses ; on peut penser, en particulier, que les prémélanoïdines exerceraient un rôle antagoniste vis-à-vis d'inhibiteurs de nature protéique, accompagnant l'enzyme dans son milieu naturel. Dans ce but, nous avons tenté de pousser plus loin la purification de l'extrait enzymatique IIb_1, par filtration sur Sephadex. Cette technique efficace dans le fractionnement des grosses molécules protéiques, par tamisage moléculaire, n'a pas encore été utilisée, à notre connaissance, dans la purification des extraits décarboxylasiques.

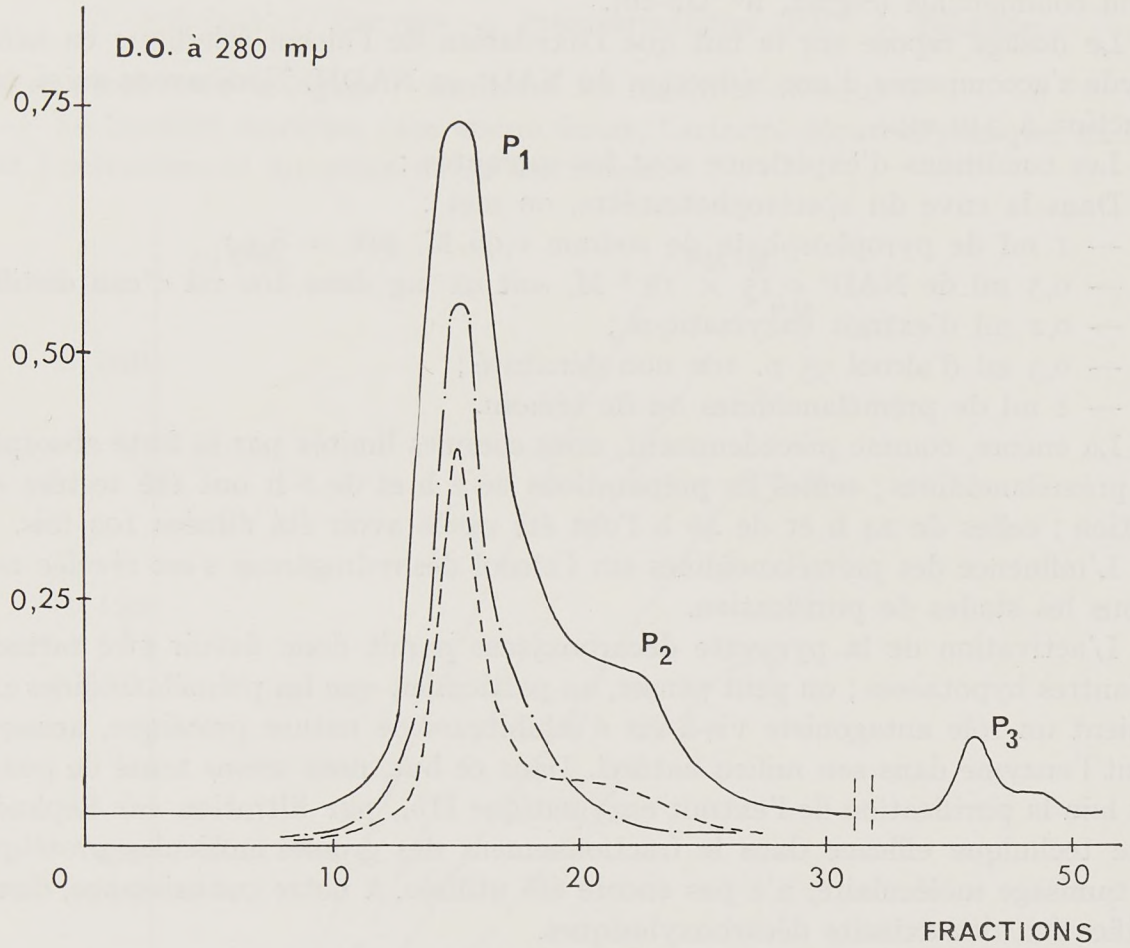
La colonne de Sephadex G 200 (140-400 Mesh), de 55 cm de hauteur et de 1,5 cm de diamètre, contient 3,5 g de produit sec, préalablement mis à gonfler dans le tampon citrate 0,04 M, pH = 6. On introduit une prise d'essai de 2 ml de l'extrait IIb_1 (environ 60 mg de matière sèche). La colonne est rincée par la solution de tampon citrate 0,04 M. L'effluent est recueilli par fractions de 5 ml. La composition protéique est évaluée par mesure d'absorption à 280 mμ.

Nous représentons sur la *figure 8* la courbe d'élution de la colonne par le tampon citrate, et, parallèlement, la répartition dans les différentes fractions des activités de la décarboxylase et de l'alcool déshydrogénase, exprimées en pourcentage de l'activité maximum. Étant donné que les poids moléculaires de ces enzymes sont très voisins, les répartitions de leurs activités sont identiques : dans les tubes 14 à 16 se trouvent concentrées à la fois la pyruvate décarboxylase et l'alcool déshydrogénase.

Comme en cours d'opération il se produit une séparation entre l'apo-enzyme et le co-enzyme de la décarboxylase, sans doute due à un phénomène de dialyse, nous avons été obligés de supplémenter le filtrat en pyrophosphate de thiamine (Sigma) et en chlorure de magnésium, pour tester l'activité de celle-ci.

Le tracé de la courbe d'élution montre, à côté du pic principal (P_1), un contrefort (P_2) (fractions 20 à 25), et un autre pic (P_3) (fraction 45 à 48).

Nous avons d'abord étudié l'action des prémélanoïdines sur le contenu des tubes 14 à 16 où se trouve localisée la pyruvate décarboxylase. Cette influence s'est révélée nulle ; de plus, la valeur de K_m n'est pas affectée : elle est égale à $3{,}3 \cdot 10^{-8}$M avec et sans addition de prémélanoïdines.



— Composition protéique
· — · Activité décarboxylasique
— — — Activité alcool déshydrogenasique

FIG. 8. — *Courbe d'élution*

On constate encore que l'influence des prémélanoïdines va en diminuant jusqu'à s'annuler au fur et à mesure que progresse la purification. Nous avons tenté d'étayer cette hypothèse de l'existence éventuelle d'inhibiteurs protéiques qui accompagneraient normalement l'enzyme, et dont l'action serait annihilée par la présence de prémélanoïdines ; nous avons cherché à voir si en introduisant chacun des pics secondaires dans le milieu de réaction contenant le substrat et le pic de la décarboxylase, l'activité de cette dernière se trouverait modifiée ; de plus, nous avons voulu préciser si, dans ces conditions, les prémélanoïdines retrouveraient une certaine activité sur l'action décarboxylasique. Les essais réalisés peuvent être schématisés comme suit :

I Milieu de réaction + P_1 + P_2 + Prémélanoïdines
II Milieu de réaction + P_1 + P_2 + Témoin *glc* — *gly*
III Milieu de réaction + P_1 + P_3 + Prémélanoïdines
IV Milieu de réaction + P_1 + P_3 + Témoin *glc* — *gly*

Les résultats de ces essais ont été complètement négatifs : l'activité de P_1 n'est en rien modifiée par l'addition de P_2 ou de P_3 et naturellement, l'influence des prémélanoïdines s'est avérée nulle.

Bien que ces effets paraissent infirmer notre hypothèse au stade de l'extrait IIb_1, elle pourrait rester valable du moins en partie, dans le cas de l'extrait initial A. Mais on ne peut encore exclure *a priori* l'hypothèse selon laquelle surviendrait, au cours de la purification, une modification de la surface active de l'enzyme empêchant une fixation de composés jouant le rôle d'inhibiteurs. Il est vrai que jusqu'ici nous n'avons considéré que l'action anti-inhibitrice des prémélanoïdines, mais l'hypothèse selon laquelle ils joueraient le rôle d'activateurs n'est pas à écarter ; dans l'état actuel des puretés de la décarboxylase, ceci reste une hypothèse puisque nous ne disposons d'aucun fait expérimental pour le démontrer.

2° La lactate déshydrogénase (E. C. : 1. 1. 2. 3)

a) *Préparation*

A 50 g de levure de boulangerie lavée plusieurs fois à l'eau distillée, on ajoute 100 ml de tampon phosphate M/15, pH = 7,2. Après centrifugation, on sépare le culot et on rejette le surnageant. Le dépôt obtenu est remis en suspension dans 100 ml de même tampon. On ajoute à cette solution 50 g de sable de quartz très fin (lavé à l'acide chlorhydrique 6 N et calciné à 900°C pendant 5 h). On effectue ensuite un broyage à l'Ultra-Turrax (Janke-Kunnel) à 20 000 tours/mn pendant 10 mn. Toutes ces opérations sont conduites à basse température. Par centrifugation, on élimine le culot et on garde le surnageant (L) auquel on ajoute 20 ml d'acétate de calcium (1 M) ; il se forme un précipité abondant que l'on sépare par centrifugation. On garde le surnageant que l'on amène à pH = 7,2 avec une soude 6 N. On ajoute à cette solution du sulfate d'ammonium jusqu'à l'obtention d'un degré de saturation de 39 p. 100. Après centrifugation, on élimine le précipité et on amène le surnageant à 60 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium. On centrifuge et, dans le précipité (M) obtenu, se trouve concentrée la lactate déshydrogénase.

b) *Dosage de l'activité*

L'activité de la lactate déshydrogénase est mesurée par la vitesse de réduction du ferricyanure de potassium, dont l'évolution est suivie à 420 mμ ; l'extrait enzymatique est suffisamment dilué pour que l'enzyme soit le facteur limitant de la réaction. Nous avons suivi pour l'essentiel les conditions d'expérience indiquées par Barré et Galzy (67) :

0,2 ml de ferricyanure de potassium 10^{-2} M
0,2 ml de lactate de sodium 10 p. 100 L (+) (Sigma)
2 ml de tampon phosphate M/15, pH = 7,2
0,2 ml d'extrait enzymatique
1 ml de prémélanoïdines ou de témoin.

c) *Action des prémélanoïdines*

Nous avons étudié l'action des prémélanoïdines de 2 h, 8 h, sans dilution, et celles de 24 h. et de 48 h. à la dilution 100, sur l'activité lactico-déshydrogénase.

Comme dans le cas de l'alcool déshydrogénase, l'influence des prémélanoïdines sur la lactate déshydrogénase s'est révélée nulle aux deux stades extrêmes de la purification de l'enzyme (extraits L et M).

Discussion.

1° En ce qui concerne la fermentation alcoolique, une influence des prémélanoïdines sur la lactate déshydrogénase, pour importante qu'elle ait pu être, n'aurait pas suffi à expliquer les phénomènes observés *in vivo*, en raison des très faibles quantités d'acide lactique produites au cours de la fermentation alcoolique.

2° Dans la mesure où l'on peut assimiler lactates déshydrogénases bactériennes et lactates déshydrogénases de la levure, une influence des prémélanoïdines ne peut pas même expliquer les faibles influences constatées *in vivo*. Il ne semble pas que l'on puisse expliquer de cette façon l'action minime des prémélanoïdines sur les ferments lactiques.

3° La pyruvate décarboxylase oxydative (E. C. : 1. 2. 2. 2)

a) *Préparation*

Nous en avons entrepris l'isolement à partir de mycélium d'*Aspergillus wentii*, obtenu après 4 jours d'incubation sur le milieu de base au saccharose.

Nous avons utilisé pour l'essentiel, le même mode opératoire que celui décrit par RAMAKRISHNAN (44) : cet auteur a utilisé, en la modifiant très légèrement, la technique de SANADI et LITTLEFIELD (68) employée par ces derniers pour la purification de l'α-cétoglutarate décarboxylase oxydative, isolée de cœur de porc : le mycélium est lavé plusieurs fois à l'eau distillée froide (2°C), puis, essoré sur verre fritté n° 2 ; à 10 g de mycélium, on ajoute 30 ml de tampon phosphate froid 0,02 M, pH = 7,2 et 10 g de sable de quartz très fin, traité comme il a été décrit précédemment (Cf. lactate déshydrogénase) ; on broie ensuite à l'Ultra-Turrax (Janke-Kunnel) à 20 000 tours/minute, pendant 10 mn ; le broyeur est arrêté toutes les 2 mn pour éviter l'échauffement. Toutes les opérations doivent être conduites sous basse température (3°C), le refroidissement étant effectué à l'aide d'un bac à glace. On obtient une suspension homogène, très fine. Par centrifugation, à 3 000 t/mn pendant 20 mn, le culot obtenu est éliminé, et le surnageant restant (P) est ajusté à pH = 5,4, avec de l'acide acétique à 10 p. 100. Un trouble léger se forme. On effectue une centrifugation plus poussée à 5 000 t/mn pendant 20 mn. On rejette le surnageant et on garde le précipité que l'on reprend avec 15 ml d'eau distillée ; on ajuste le pH de cette solution à 7,2 avec de la soude 6 N, et on la soumet alternativement pendant trois cycles successifs, à une congélation et fusion ; une certaine quantité de protéines sont ainsi coagulées ; par centrifugation, à 5 000 t/mn pendant 20 mn, on aboutit à un surnageant clair (Q) où se trouve notamment localisée la pyruvate décarboxylase oxydative.

b) *Méthode de dosage*

L'activité de l'enzyme est mesurée par la réduction du 2-6-dichlorophénol-indophénol qui accompagne l'oxydation du pyruvate en acétate. On suit l'évolution du premier à 600 mμ.

Les conditions d'expérience ont été les mêmes que celles de RAMAKRISHNAN (44) : Dans la cuve du spectrophotomètre, on met :

— 0,5 ml d'extrait enzymatique,
— 0,2 ml de thiamine pyrophosphate (TPP) (Sigma), 10 mg/10 ml d'eau distillée,
— 0,1 ml de Cl_2Mg 0,2 M,
— 1 ml de tampon phosphate 0,02 M, pH = 7,2,
— 0,1 ml de 2-6-dichlorophénol-indophénol à 0,11 p. 100,
— 0,2 ml de pyruvate de potassium 0,5 M,
— 1 ml de prémélanoïdines ou de témoin.

c) *Action des prémélanoïdines*

Nous avons étudié le comportement de deux extraits (P) et (Q), en présence des prémélanoïdines 2 h et 8 h sans dilution, et des prémélanoïdines 24 h et 48 h diluées 100 fois.

Les tableaux 38 et 39 représentent les résultats obtenus, donnés par les valeurs du rapport $\frac{V}{V_T}$, où V est la vitesse de réduction du 2-6-dichlorophénol-indophénol, en présence de prémélanoïdines, et V_T la vitesse du témoin.

On voit que les prémélanoïdines sont nettement activatrices et que, là encore, l'activité semble diminuer au fur et à mesure que progresse la purification.

TABLEAU 38

Extrait P

Prémélanoïdines de	2 h	8 h	24 h	48 h
Dilutions	1	1	100	100
$\frac{V}{V_T}$	1,30	1,35	1,15	1,20

TABLEAU 39

Extrait Q

Prémélanoïdines de	2 h	8 h	24 h	48 h
Dilutions	1	1	100	100
$\frac{V}{V_T}$	1,20	1,22	1,10	1,13

Conclusion

En résumé, les limites d'action des préparations de prémélanoïdines sur l'activité enzymatique *in vitro* de la pyruvate décarboxylase et de la pyruvate décarboxylase oxydative ont été précisées. L'explication la plus simple que nous avons été en mesure de vérifier serait qu'elles jouent un rôle d'anti-inhibiteurs, vis-à-vis de substances accompagnant l'enzyme, puisque, comme nous l'avons noté, leur action diminue au fur et à mesure que la purification de l'extrait est poussée.

Il semblerait aussi que ces prémélanoïdines, au moins au niveau du pyruvate, agissent spécifiquement sur les systèmes décarboxylasiques puisque aucune action n'a été relevée sur l'alcool déshydrogénase ni sur la lactate déshydrogénase.

De toutes façons, il ne semble pas que la décarboxylase des levures et celle des ferments citriques soient le système enzymatique le plus directement responsable des effets constatés *in vivo*, par action des prémélanoïdines sur la fermentation alcoolique et citrique ; alors que nous avions observé une activation maximum, d'une part de la décarboxylation pour les levures, d'autre part de la formation d'acide citrique pour les ferments citriques, à très faibles concentrations de prémélanoïdines dans le milieu de fermentation, nous ne retrouvons pas ce phénomène avec les deux décarboxylases ; l'activation va en diminuant avec la concentration des effecteurs.

RÉSUMÉ

L'objet de ce travail fait suite à celui de SHEIKH et coll. qui ont étudié l'influence des prémélanoïdines sur la fermentation alcoolique et le développement de la levure.

Dans une *première partie*, nous avons examiné comment réagissaient aux produits de la réaction de MAILLARD — résultant du chauffage d'une solution de glucose et de glycocolle — des microorganismes tels que les ferments lactiques et citriques, soit du point de vue de leur métabolisme, soit du point de vue de leur développement. Les résultats des observations varient avec le type de microorganisme étudié ; de plus, pour un même type de microorganisme, le résultat de la présence des prémélanoïdines se traduit par des effets parfois opposés ; souche utilisée, composition de milieu de culture, type et concentration des prémélanoïdines, sont autant de facteurs qui influent sur le sens et l'intensité de la réponse du microorganisme.

Avec les ferments lactiques, dont trois souches homofermentatives ont été examinées, la présence de prémélanoïdines se manifeste par des variations de vitesse de croissance ou de production d'acide lactique. Les très faibles doses de prémélanoïdines ont une action faible ou nulle.

Avec les deux souches de ferments citriques étudiées, on a observé par addition de prémélanoïdines un effet sensible, d'une part, sur la vitesse de production d'acide et de mycélium, d'autre part, sur la production globale de ces deux éléments. De plus, il nous a paru remarquable de retrouver, dans le cas de ces moisissures, une influence des prémélanoïdines, à très faibles doses, semblable à celle rapportée par SHEIKH sur les levures.

L'ensemble de ces résultats, joints à ceux de SHEIKH, conduit à admettre que les produits de la réaction de MAILLARD exercent un effet, soit activateur soit inhibiteur, sur le métabolisme de microorganismes tels que la levure, les moisissures et les bactéries.

Dans la *deuxième partie* de notre travail, nous avons essayé de chercher une explication à ces phénomènes observés *in vivo*, et nous avons pour cela tenté de préciser l'action de ces mêmes produits sur des réactions enzymatiques, observées *in vitro*, après extraction des enzymes à partir de microorganismes.

Tandis que l'action des prémélanoïdines s'est révélée nulle, à tous les stades de purification, sur l'alcool déshydrogénase et la lactate déshydrogénase, une action nettement activatrice a été observée chez deux enzymes responsables de la décarboxylation : la pyruvate décarboxylase et la pyruvate décarboxylase oxydative.

Cette influence est, d'une part, d'autant plus forte que le temps de chauffage des préparations est plus long, et d'autre part, d'autant plus faible que les extraits enzymatiques sont plus purifiés.

L'explication la plus simple de ces observations est que les prémélanoïdines exerceraient une action antagoniste vis-à-vis d'inhibiteurs accompagnant les deux enzymes dans leur milieu naturel. Cette action n'est certainement pas la seule à mettre en cause : l'hypothèse selon laquelle les prémélanoïdines joueraient un rôle propre d'activateurs n'est pas à exclure. On doit alors admettre qu'elles perdent cette propriété à la suite d'une modification de l'enzyme, au cours de la purification de l'extrait enzymatique.

SUMMARY

ON THE BEHAVIOUS OF TWO TYPES OF MICROORGANISMS AND OF DIFFERENT ENZYMES IN THE PRESENCE OF MAILLARD REACTION PRODUCTS

This work follows up SHEIKH and collaborators study of the effect of premelanoïdins on alcoholic fermentation and yeast growth.

In the first part, we have studied the behaviour of microorganisms such as lactic and citric ferments when coming into contact with Maillard reaction products — resulting from heating a solution of glucose and glycine — either on the point of view of their metabolism, or on the point of view of their development.

The results from observations vary as the microorganism type studied ; moreover, for microorganisms of one same type, the premelanoïdins presence results sometimes into opposite effects : strain used, culture medium composition premelanoïdins type and concentration, are so many factors to affect the direction and intensity of the microorganism response.

To regards lactic ferments, three homofermentative strains of which have been examined, the presence of premelanoïdins brings about variations in growth rate or lactic acid production. The very low premelanoïdins doses have a weak or non existent effect.

With both citric ferments strains as studied, we observed when adding premelanoïdins a noticeable effect, on one hand, on the acid and mycelium rate of production, on the other hand on the total production of these two factors. Moreover, our attention has been drawn to the fact that in the case of these moulds, premelanoïdins in very small quantities are found again to have some influence, same as the one on yeasts related by SHEIKH.

The results as a whole, together with SHEIKH's lead to admit that the Maillard reaction products have an action, either an enhancing or an inhibiting one, on the metabolism of microorganisms such as yeast, molds and bacteria.

In the second part of our work, we have tried to account for these phenomena studied *in vivo*, and therefore we have endeavoured to state more precisely the action of these same products on enzymatic reactions as observed *in vitro*, after extracting enzymes out of the microorganisms.

Whereas the action of premelanoïdins proved non-existent at every stage of purification, on alcohol dehydrogenase and lactate dehydrogenase, two decarboxylation enzymes have been noted to show a clearly activating influence : pyruvate decarboxylase, and pyruvate decarboxylase oxydative.

This influence is, on one hand, all the stronger as the heating period of preparations is longer, and on the other hand, all the slighter as the enzymatic extracts are more purified.

The simpler way to account for these observations is to assume that premelanoïdins exert an antagonistic influence on inhibitors which attend on both enzymes in their natural medium. This action is certainly not the only one to be implied : the hypothesis according to which the premelanoïdins might play their own activating part is not to be thrown up. It must then be assumed that they lose this property once the enzyme has altered during the purification of the enzymatic extract.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) MAILLARD L. C., 1912. Action des acides aminés sur les sucres : formation des mélanoïdines par voie méthodique. *C. R. Acad. Sci.*, **154**, 66-68.

(2) ENDERS C., 1938. Zur Kenntnis der Melanoidine. *Kolloïd Z.*, **85**, 74-87.

(3) STADTMAN E. R., 1948. Non enzymatic browning in fruit products. *Adv. Food Res.*, **1**, 325-372.

(4) DANEHY J. P., PIGMAN W. W., 1951. Reactions between sugars and nitrogenous compounds and their relationship to certain food problems. *Adv. Food Res.*, **3**, 241-290.

(5) HODGE J. E., 1953. Chemistry of browning reactions in model systems. *Agric. Food Chem.*, **1**, 928-943.

(6) ELLIS G. P., 1959. The MAILLARD reaction. *Adv. Carb. Chem.*, **14**, 63-136.

(7) REYNOLDS T. M., 1963. Chemistry of non enzymatic browning. I. The reaction between aldoses and amines. *Adv. Food Res.*, **12**, 1-52.

(8) CHICHESTER C. O., STADTMAN F. H., Mc KINNEY G., 1952. On the products of the MAILLARD reaction. *J. Amer. Chem. Soc.*, **74**, 3418-3420.

(9) SCHÖNBERG A., MOUBACHER R., 1952. The Strecker degradation of α-amino acids. *Chem. Rev.*, **50**, 261-277.

(10) PATTON A. R., HILL E. G., FOREMAN E. M., 1948 *b*. Amino acid impairment in casein heated with glucose. *Science*, **107**, 623.

(11) PATTON A. R., HILL E. G., FOREMAN E. M., 1948 *b*. The effect of browning on the essential amino acid content of soy globulin. *Science*, **108**, 659.

(12) MENDEN E., CREMER H. D., 1956. Über nicht enzymatische Bräunungsreaktionen und ihre physiologischen Folgen. *Z. Lebensm. Unters, Forsch*, **104**, 33-43.

(13) SHEIKH N. M., GODON B., PETIT L., 1961. Influence des produits de la réaction de MAILLARD sur la fermentation alcoolique et le développement de la levure. *Ann. Technol. agric.*, **10**, 1, 5-42.

(14) HUGGETT A. St. G., NIXON D. A., 1957. Enzymatic determination of blood glucose. *Biochem. J.* **66**, 12 p.

(15) SHAEFFER P. A., HARTMANN A. F., 1920-1921. The iodometric determination of copper and its use in sugars analysis II. Methods for determination of reducing sugars in blood, wine, milk and other solutions. *J. Biol. Chem.*, **45**, 365-390.

(16) THOMPSON J. F., ZACHARIUS P. M, STEWARD F. C., 1951. Investigations on nitrogen compounds and nitrogen metabolism in plants. I. The reactions of nitrogen compounds with ninhydrin on paper : a quantitative procedure.

(17) STARON T., ALLARD C., CHAMBRE M. M., 1961. Nouvelle méthode de chromatographie sur papier et de dosage des acides aminés. *C. R. Acad. Sci.*, **253**, 1630-1632.

(18) PETIT L., 1959. Recherches sur la réaction de MAILLARD. *Ann. Technol. agric*, **1**, 5-23.

(19) ORLA JENSEN A. D., 1933. Hitherto unknown activators for the growth of lactic acid bacteria. *J. Soc. Chem. Ind.*, **52**, 374 T-379 T.

(20) RABINOWITZ J. C., SNELL E. E., 1947. The Vitamin B_6 group. XI. An improved method for assay of vitamin B_6 with *Str faecalis*. *J. Biol. Chem.*, **169**, 631-642.

(21) SMILEY K. L., NIVEN C. F., SHERMAN J. R., SHERMAN J. M., 1943. The nutrition of *Str. salivarius*. *J. Bacteriol*, **45**, 445-454.

(22) ROSE C. S., FELDBAUM E. P., NORRIS R. F., GYÖRGY P., 1952. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **81**, 709.

(23) ROSE D., PETERSON R., 1949. Influence of the amino acid — Dextrose reaction on growth of lactic acid bacteria. *Canad. J. Res.*, **27**, Sect. B, 428-436.

(24) ROGERS D., KING T. E., CHELDELIN V. H., 1953. Growth stimulation of *Lactobacillus gayoni* by N-D glucosylglycine. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **82**, 140-144.

(25) CHELDELIN V. H., KING T. E., 1953. Nutrition of microorganisms. *Ann. Rev. Microb.*, **7**, 113.

(26) RAMSEY H. H., LANKFORD L. E., 1956. Stimulation of growth initiation by heat degradation product of glucose. *J. Bacteriol.*, **72**, 511-518.

(27) AUCLAIR J. E., PORTMANN E., 1958. Effet stimulant du lait autoclavé sur la croissance de *L. lactis*. *Ann. Technol. agric.*, **2**, 129-150.

(28) Foster E. M., 1952. The effect o f heat on milk as a culture medium for lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.*, **35**, 988-997.

(29) Parker R. B., Elliker P. R., 1954. Effect of heat treatment of milk on subsequent activity of starter culture. *Proc. W. Div. Amer. Sci. Ass.*, 361-365.

(30) Patton A. R., Hill E. G., 1948 *a*. Inactivation of nutrients by heating with glucose. *Science*, **107** 68.

(31) Mc Allister R. A., 1954. The inactivation of certain nutrients in culture media by heating with glucose and its relation to the growth of certain lactobacilli. *J. Med. Lab. Technol.*, **12**, 74-79.

(32) Lankford C. E., Ravel J. M., Ramsey H. H., 1957. The effect of glucose and heat sterilization on bacterial assimilation of cystine. *Appl. Microbiol.*, **5**, 65-69.

(33) Auclair J. E., 1953. *Studies on the antibacterial properties of cow's milk.* Ph. D. Thesis, University of Reading, 1953.

(34) Auclair J. E., Portmann E., 1956. *Influence du chauffage du lait aux températures de pasteurisation et de stérilisation sur la croissance des bactéries lactiques.* 14e Congrès International. Laiterie, Rome Vol., **1**, Partie 2, 17-30.

(35) Finkelstein R. A., Lankford C. E., 1957. A bacteriotoxic substance in autoclaved culture media containing glucose and phosphate. *Appl. Microbiol.*, **5**, 74-79.

(36) Sharpe M. E., 1961. Taxinomie des *Lactobacillus*. *Ann. Inst. Pasteur*, Lille, **12**, 1-16.

(37) Snell E. E., Wright L. D., 1941. *J. Biol. Chem.*, **139**, 675.

(38) Monod J., 1942. *Recherches sur la croissance de cultures bactériennes.* Thèse.

(39) Johnson B. C., 1948. *Methods of vitamin determination.* Burgess Publ. Edit., **426**, South 6th Street, Minneapolis.

(40) Wehmer C., 1893. Note sur la fermentation citrique. *Bull. Soc. Chim.*, **9**, 728-730.

(41) Wehmer C., 1893. Préparation d'acide citrique de synthèse, par la fermentation du glucose. *C. R. Acad. Sci.*, **117**, 332.

(42) Lewis K. F., Weinhouse S., 1951. Studies on mecanism of citric acid production in *Aspergillus niger*. *J. Amer. Chem. Soc.*, **73**, 2500-2503.

(43) Martin S. M., 1954. The succinoxidase system in *Aspergillus niger*. *Canad. J. Microbiol.*, **1**, 6-11.

(44) Ramakrishnan C. V., 1954. The tricarboxylic acid cycle in *Aspergillus niger*. *Enzymologia*, **17**, 3, 169-174.

(45) Ramakrishnan C. V., Steel R., Lentz C. P., 1955. Mechanism of citric acid formation and accumulation in *Aspergillus niger*. *Arch. Biochem. and Biophys.*, **55**, 270-273.

(46) Cochrane V. W., 1958. *Physiology of fungi.* New York, John Willey and Sons. Inc., 138.

(47) Currie J. N., 1917. The citric acid fermentation of *Aspergillus niger*. *J. Biol. Chem.*, **31**, 15-37

(48) Doelger W. P., Prescott S. C., 1934. Citric acid fermentation. *Ind. Eng. Chem.*, **26**, 1142-1149.

(49) Shu P., Johnson M. J., 1948. Citric acid production by submerged fermentation with *Aspergillus niger*. *Industr. Engng. Chem.*, **40** (7), 1202-1205.

(50) Perlman D., 1946. *Arch. Biochem.*, **11**, 123.

(51) Bertrand D., de Wolf A., 1962. Influence du fer et du manganèse comme oligo-éléments sur la synthèse de l'aconitase chez *Aspergillus niger*. *C. R. Acad. Sci.*, **254**, 4381-4383.

(52) Quilico A., Dicapua E. A., 1932. Sopra l'influenza del ferro sulla fermentazione citrica dell' *Aspergillus niger*. *Chim. et Industria* (Milan), **14**, 289.

(53) Perlman D., Dorrel W. W., Johnson M. J., 1946. Effect of metallic ions on the production of citric acid by *Aspergillus niger*. *Arch. Biochem.*, **10**, (3), 131-134.

(54) Steinberg R. A., Bowling J. D., 1939. *J. Agric. Res.*, **58**, 717-732.

(55) Perlman D., Kita D. A., Peterson W. H., 1946. Production of citric acid from cane molasses. *Arch. Biochem.*, **11**, (Lo), 123-129.

(56) Roberts O., Murphy D., 1944. A rapid fermentation method for a production of calcium citrate and calcium gluconate from beet molasses. *Sci. Proc. Roy. Dublin Soc.*, **23**, 307-314.

(57) Gerhardt P., Dorrell W. W., Boldwin I. L., 1946. Citric acid fermentation of beet molasses. *J. Bacteriol.*, **52**, (5), 555-564.

(58) Clark D. S., 1962. *Submerged citric acid fermentation of sugar beet molasses.* I and E. C. Product. Res. and Devel., 1, 59-62.

(59) Malo J. L., Regueiro B., 1957. Estudios sobre produccion de acido citrico por fermentacion. *Microbiologia Española*, **10**, (4), 425-450.

(60) Cheftel R. I., Munier R., Macheboeuf M., 1951. Microchromatographie de partage sur papier des acides aliphatiques hydro-solubles et non volatils. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **33**, (7), 840-845.

(61) Bove J., Raveux R., 1957. La séparation et la détermination des acides carboxyliques de C_1 à C_6 par chromatographie de partage sur colonne de silice. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 368-381.

(62) Bryant F., Overell B. T., 1953. *Biochem. Biophys. Acta*, **10**, 471-476.

(63) Green D. E., Herbert D., Subrahmanyan V., 1940. Carboxylase. *J. Biol. Chem.*, **138**, 327-339.

(64) Henri V., 1903. *Lois générales de l'action des diastases.* Thèse de Sciences, Paris.

(65) MICHAELIS L., MENTEN M. L., 1913. *Biochem.*, **2**, **49**, 333.

(66) LINEWEAVER H., BURK D., 1934. *J. Amer. Chem. Soc.*, **56**, 658.

(67) BARRÉ P., GALZY P., 1962. Étude d'un lactobacille homofermentatif isolé du vin. *Ann. Techno. agric.*, **11**, (2), 121-130.

(68) SANADI D. R., LITTLEFIELD J. W., BOCK R. M., 1952. Studies on α-Ketoglutaric oxidase. *J. Biol. Chem.*, **197**, 831-862.

Ann. Technol. agric., 1966, **15** (1), 73-77

LA DIMINUTION DES COMPOSÉS AZOTÉS DANS LE VIN PAR DIFFÉRENTS COLLAGES

D. TERCELJ

Institut agricole de Slovénie, Ljubljana (Yougoslavie)

SOMMAIRE

Nous avons étudié la diminution des teneurs des composés azotés, en particulier des acides aminés libres, dans le vin soumis à différents collages.

INTRODUCTION

La plupart des auteurs ont étudié les composés azotés y compris les acides aminés libres dans le vin, mais très peu de recherches ont été effectuées sur l'influence des différents procédés technologiques et en particulier sur le rôle des collages par différents procédés.

Lafon-Lafourcade et Peynaud (1961) signalent que le traitement des vins blancs à la bentonite modifie les concentrations en acides aminés. La bentonite à la dose de 100 g par hl fixe 50 à 100 mg par litre d'acides aminés et de petits polypeptides, constitués d'arginine, de thréonine, de lysine, de sérine et de glycine soit une perte d'azote aminé de 8 à 16 mg par litre.

L'élimination de certains composés azotés est très importante pour la stabilisation des vins. Les divers procédés de collage utilisés dans les caves de Slovénie ont été étudiés.

Le présent travail est limité à l'influence de divers collages et du traitement par la résine cationique sur la composition azotée du vin.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'azote total a été déterminé par la méthode de Kjeldahl, l'ammoniaque par la distillation directe en milieu alcalin, les acides aminés libres par chromatographie quantitative sur papier (Fauconneau et Pion, 1959). Ces méthodes de dosage ont été décrites ailleurs (Terčelj, 1965).

Pour effectuer les essais on a utilisé le vin Sauvignon de Slovénie *Ormoz*, vin de l'année 1962, analysé au printemps 1964. Le raisin a été pressé et le moût laissé à fermenter à température basse :

15°C. La fermentation a duré trois semaines et le premier soutirage a eu lieu deux mois après et le deuxième soutirage au mois de juin. Dans ces conditions le vin étudié est caractérisé par un contact sur lie d'une durée de deux mois au cours desquels il a bénéficié de l'autolyse des levures. Il est donc particulièrement riche en acides aminés et en protéines ; c'est la caractéristique des vins de qualité de Slovénie du Nord, Styrie. Au printemps 1964, les collages ont été effectués en employant les doses des produits indiqués ci-dessous. Les doses minima ont donné les vins les plus limpides.

— Vin I : non traité par des moyens de clarification ;
— Vin II : le vin I traité au collage bleu : 5 g de ferrocyanure de potassium /hl ;
— Vin III : le vin I traité à la gélatine et au tanin : 10 g/hl de gélatine et 8 g/hl de tanin ;
— Vin IV : le vin I traité à la bentonite : clarol 50 g/hl ;
— Vin V : le vin I traité par chauffage à 50°C : le vin chauffé à la température 50°C est mis en bouteille et on laisse refroidir à la température ambiante ;
— Vin VI : le vin I traité par chauffage à 50°C associé au collage bleu.

Après la clarification tous ces vins ont été filtrés sur filtre à plaques d'amiante.

— Vin X : vin blanc non traité à la résine cationique ;
— Vin XI : vin traité à la résine cationique à l'aide de l'appareil de Giannazza, que la cave n'utilise que pour les vins ordinaires.

Le vin blanc de l'année 1963 a été traité au printemps 1964.

RÉSULTATS

Le collage bleu diminue très peu les teneurs en azote total (1,4 p. 100) et en acides aminés libres (1 p. 100). Celle des protéines est diminuée de 16,7 p. 100. Presque tous les acides aminés libres restent invariables.

TABLEAU I

Répartition des composés azotés dans les différents échantillons étudiés

	1 N total (mg/l)	2 N total de l'extrait alcoolique (mg/l)	3 N ammoniacal (mg/l)	4 N α-aminé (mg/l)	1-2 N protéique (mg/l)	2-/3+4/ N composés inconnus (mg/l)	N α-aminé p. 100 de N total
Vin I	726,0	690,0	45,4	364,7	36	279,9	50,2
Vin II.....	716,0	686,0	45,0	360,9	80	280,1	50,4
Vin III.....	675,0	650.0	45,2	357,7	25	247,1	53,0
Vin IV	676,0	650,0	42,0	355,5	26	252,4	52,6
Vin V.....	726,0	690,0	46,0	367,0	36	277,0	50,5
Vin VI	696,0	677,0	47,0	358,0	19	272,0	51,4
Vin X.....	276	260	14	205,7	16	40,3	74,53
Vin XI.....	173	160	11	128,1	13	20,9	74,05

Le collage à la gélatine et au tanin et le collage à la bentonite diminuent la teneur en azote total de 7 p. 100. La gélatine et le tanin diminuent la teneur des protéines de 30,60 p. 100, celle des acides aminés libres de 1,9 p. 100 et celle des polypeptides de 11,7 p. 100. La bentonite diminue la teneur des protéines de 27,8 p. 100, celle des acides aminés libres de 2,5 p. 100 et celle des polypeptides de 9,8 p. 100. L'action de la gélatine est voisine de celle de la bentonite.

Le chauffage à 50°C sans collage laisse les composés azotés intacts ; mais si on associe le collage bleu, l'action est particulièrement importante sur les protéines dont les teneurs sont diminuées de 47,2 p. 100. Les acides aminés libres et les polypeptides restent invariables, l'ammoniac n'est pas modifié par les divers collages.

Le collage à la résine cationique (cf. tabl. 1 et 3) a une influence beaucoup plus efficace sur les composés azotés. L'azote total est diminué de 37,3 p.100, celle de l'azote protéique de 18,75 p. 100, celle des acides aminés libres de 37,7 p. 100 et celle des polypeptides de 48,1 p. 100. La plupart des acides aminés sont éliminés dans des proportions de 70 à 80 p. 100. Les moins attaqués sont la tyrosine (12,4 p. 100 de perte) et la proline (14,70 p. 100 de perte).

Le traitement du vin par la plupart des collages étudiés a une très faibles influence sur les composés azotés sauf sur les protéines, qui ne représentent que la plus petite partie des composés azotés du vin. Seul le collage à la résine a une influence très grande sur les composés azotés et diminue de manière importante l'azote du vin ; il pourrait être le collage le plus efficace pour la stabilisation du vin. Mais en étudiant la stabilité du vin il faudrait examiner aussi l'influence du traitement sur le caractère organoleptique du vin et sur les autres constituants que l'azote. La

TABLEAU 2

Diminution en mg/l des teneurs des acides aminés libres du vin Sauvignon due aux collages

Acides aminés	Vin I	Vin II	Vin III	Vin IV	Vin V	Vin VI
Acide aspartique	66,95	66,35	59,25	59,95	64,25	62,3
Acide glutamique	122,20	123,80	124,00	123,90	125,25	122,7
Cystine cystéine	traces	traces	traces	traces	traces	traces
Sérine	59,00	58,00	63,85	56,25	62,20	59,0
Glycine	19,35	19,35	18,65	17,80	17,70	15,5
Asparagine	11,20	12,00	11,70	12,80	12,05	12,5
Lysine	31,65	27,75	27,45	29,35	30,20	25,7
Thréonine	46,00	44,75	45,40	46,50	44,50	44,1
Alanine	171,95	170,00	173,75	171,75	173,20	170,4
Ac. γ-amino butyrique	79,20	74,45	69,00	68,80	42,45	41,2
Valine	22,65	22,15	26,70	26,70	18,40	17,9
Leucine	34,15	32,30	31,45	32,10	35,30	30,5
Isoleucine	11,50	11,40	11,50	12,65	10,60	10,2
Phénylalanine	38,70	40,50	40,25	43,10	40,70	41,4
Proline	518,00	517,00	510,00	502,50	527,25	496,6
Histidine	30,45	30,40	30,10	31,50	36,05	40,9
Arginine	603,90	600,50	593,95	589,50	624,00	618,3
Hydroxypipécolique	58,50	56,30	55,10	56,00	55,80	52,2
Méthionine sulfoxyde	6,80	6,75	5,50	6,55	5,35	5,3
Tyrosine	28,30	29,15	30,75	34,05	28,75	30,2
Baikiaine	3,75	3,60	3,35	3,25	3,30	3,5
Ornithine	9,05	8,25	7,10	6,10	8,45	4,2
Sucre aminé	3,30	3,30	2,05	3,25	2,20	traces
Au-dessous de histidine (Rf. 0,75 — 0,11)	8,25	5,45	4,05	3,95	—	2,2
Est de glutamique (Rf. 0,35 — 0,39)	3,80	4,20	2,80	2,55	4,10	traces
Nord de proline (Rf. 0,75 — 0,30)	2,95	2,95	2,90	3,05	3,10	2,8
Sommes	1 991,55	1 970,65	1 950,60	1 943,90	1 975,15	1 909,6

constitution du vin peut en effet être profondément modifiée, comme le montrent les analyses effectuées au printemps 1964 sur le vin n° X, avant et après passage sur la résine cationique dont voici les résultats (en g/l) :

	Avant le traitement	Après le traitement à la résine
	—	—
Alcool	90,6	89,5
Extrait	19,4	18,7
Acidité totale (acidité sulfurique)	4,3	3,8
Cendres	2,03	2,13
K	0,76	0,06
Na	0,02	0,25
Ca	0,05	0,02
P	0,06	0,06

TABLEAU 3

Diminution des teneurs en acides aminés du vin due au traitement par la résine

	Acides aminés				
	mg/l		% de diminution	% du total des A.A.	
	Vin X	Vin XI		Vin X	Vin XI
Acide aspartique	28,8	6,0	79,2	2,4	0,8
Acide glutamique	30,7	8,6	72,0	2,6	1,1
Cystine cystéine	traces	traces	—	—	—
Sérine	14,3	3,8	73,4	1,2	0,5
Glycine	14,0	5,1	63,6	1,2	0,7
Asparagine	traces	traces	—	—	—
Lysine	20,7	3,8	81,6	1,7	0,5
Thréonine	13,5	2,8	79,3	1,1	0,4
Alanine	55,2	8,5	84,6	4,6	1,1
Acide γ-amino butyrique	22,3	28,7	—	1,9	3,8
Valine	14,3	2,5	82,5	1,2	0,3
Leucine	28,4	4,7	83,3	2,35	0,6
Isoleucine	12,6	1,0	92,1	1,05	0,1
Phénylalaline	30,1	5,9	80,4	2,5	0,8
Proline	550,4	469,4	14,7	46,0	62,1
Histidine	22,6	11,7	48,2	1,9	1,55
Arginine	293,6	178,2	44,6	24,6	23,6
Hydroxypipécolique	17,2	—	100,0	1,4	—
Méthionine sulfoxyde	4,2	1,6	61,9	0,35	0,2
Tyrosine	8,9	7,8	12,4	0,7	1,0
Maikiaine	1,8	1,1	38,9	0,15	0,15
Ornithine	4,8	4,8	—	0,4	0,6
Sucre aminé	1,5	0,4	73,3	0,1	0,05
Au-dessous de histidine (Rf. 0,75 — 0,11)	1,8	—		0,15	—
Est de glutamique (Rf. 0,35 — 0,39)	2,0	—		0,2	—
Nord de proline (Rf. 0,75 — 0,30)	2,1	—		0,2	—
Sommes	1 195,5	7 56,4	36,7	99,95	99,95

D'après ces données on voit que le traitement à la résine change très fondamentalement les autres constituants et le caractère des vins.

En conclusion de ce travail, on note que les différents collages (ferrocyanure de potassium, gélatine, tanin, bentonite, chauffage) laissent les acides aminés libres et l'ammoniac presque intacts, mais diminuent les teneurs des protéines. En revanche, le traitement du vin par la résine cationique élimine beaucoup d'acides aminés libres, de petits peptides et peu de protéines.

Reçu pour publication en décembre 1965.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué pendant mon séjour au C.N.R.Z. à Jouy-en-Josas où M. FAUCONNEAU, directeur du Laboratoire des Métabolismes, m'a procuré une aide aussi aimable qu'efficace et je tiens à l'en remercier ici.

SUMMARY

REDUCTION OF NITROGENEOUS COMPOUNDS IN WINE
BY DIFFERENT CLARIFICATION METHODS

The reduction of nitrogen compounds, in particular the free amino acids, in wine by different clarification methods is described in the paper.

Clarification with ferrocyanide, gelatine, tannin, bentonite, or by heating up to 50°C leaves almost intact the free amino acids and the NH_4, while the protein content is reduced.

A treatment with ion exchange resins, however, largely reduces the free amino acids, while the protein content is reduced to a lasser extent.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

FAUCONNEAU G., PION R., 1959. L'utilisation de diverses méthodes de dosage des acides aminés dans les études nutritionnelles. (Intérêt et limites de la chromatographie quantitative sur papier. *Techn. Trav. Exp. Cahiers A. E. C.*, 1960, **4**, 112-119.

LAFON-LAFOURCADE S., PEYNAUD E., 1961. Composition azotée des vins en fonction des conditions de vinification. *Ann. Technol. agric.*, **10**, 143-160.

TERCELJ D., 1965. Les composés azotés dans le vin. *Ann. Technol. agric.*, 1965, **14**, 307-319.

Ann. Technol. agric., 1966, **15** (1), 79-97

ÉTUDE DE QUELQUES FACTEURS CONDITIONNANT LA FILTRATION DES VINS NOUVEAUX

M. FEUILLAT et J. BERGERET

Centre d'Études de Viticulture et d'Œnologie de l'Université de Dijon, Laboratoire d'Œnologie de la Faculté des Sciences, Dijon (Côte d'Or)

SOMMAIRE

L'étude des facteurs de la filtration a été conduite sur des vins blancs, rosés et rouges jeunes, essentiellement chargés de levures au repos, les uns collés à la bentonite à l'état de moût ou de vins faits, les autres n'ayant pas subi ce traitement, dans le but de dégager les moyens susceptibles de conférer une stabilité rapide, tout en respectant les caractères organoleptiques de ces vins de primeur. Elle permet notamment de mettre en évidence l'influence de la nature des troubles et celle des matières filtrantes sur le débit et la couleur.

I. — INTRODUCTION

La limpidité revêt actuellement dans la commercialisation des vins une importance primordiale. Le problème pour les praticiens n'est pas tant de faire un choix entre les deux méthodes classiques de clarification, collage ou filtration, que de savoir associer d'une façon convenable les deux traitements.

L'expérimentation que nous rapportons aujourd'hui et qui traite de la filtration des vins jeunes, précédée ou non d'un collage à la bentonite, a été envisagée avec cette optique.

Comme dans toute opération de filtration, deux problèmes ont retenu notre attention :

— un problème de rendement, qui porte sur le débit du filtre et son colmatage au fur et à mesure que les impuretés se déposent sur la couche filtrante ;

— un problème d'efficacité, que l'on apprécie par la limpidité obtenue, étant

bien entendu que les qualités organoleptiques des vins traités doivent être le plus possible respectées.

L'un et l'autre de ces problèmes dépendent d'une façon étroite de deux facteurs principaux : la nature de la matière filtrante et la nature des troubles en suspension dans le vin.

Toutes nos opérations ont été conduites sur plaques de cellulose amiante d'origine « Seitz » et de types différents quant à la porosité, selon les pourcentages des deux matières. Les vins traités sont tous des vins jeunes, blancs, rosés et rouges dont les troubles sont essentiellement constitués par des levures adultes ayant cessé leur croissance, associées ou non à la bentonite.

Une partie du lot des vins blancs étudiés avait été additionnée de bentonite à l'état de moût, donc avant le départ de la fermentation. Nous verrons que le filtrage de ces vins s'en est trouvé facilité, tant du point de vue quantitatif (débit plus grand), que du point de vue qualitatif (meilleure limpidité obtenue). C'est donc là un avantage supplémentaire de ce traitement des moûts, dont l'intérêt a été largement démontré par Milisavljevic (1963).

Par contre, un traitement à la bentonite des vins faits, c'est-à-dire l'incorporation précédant la filtration, entraîne de grosses difficultés pratiques à cause d'un colmatage très rapide des filtres. L'importance de ce phénomène a été chiffrée par Ribéreau-Gayon et Peynaud (1961). Ces deux auteurs préconisent comme techniques améliorantes du débit, soit l'utilisation de filtres à alluvionnage continu, soit la floculation de la bentonite par un collage avant de filtrer.

Nos études sur les vins rouges jeunes et sur quelques vins rosés, macérés ou non, ces derniers étant produits en petite quantité en Bourgogne, constituent une suite aux travaux qui ont déjà fait l'objet de plusieurs exposés (Bergeret, 1963, *a*, *b*, *c*) et qui traitent de l'action des colles et des matières filtrantes à base de cellulose-amiante sur la robe du vin. Des essais analogues effectués sur des vins de Bordeaux ont été rapportés récemment au Colloque de l'I. T. V. à Colmar par Peynaud et Sudraud (1964).

II. — TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES ET MATÉRIEL UTILISÉ

Quatre types de vins, appartenant à la récolte 1964 du Centre d'Études de Viticulture et d'Œnologie de l'Université de Dijon ont été étudiés :

un blanc « Aligoté »
un « rosé » de *Pinot noirien* non macéré
un « rosé » de *Pinot* macéré 48 heures
un « rouge » de *Pinot* macéré une semaine

Tous proviennent d'une vendange saine. Dans le tableau 1 figurent les principales caractéristiques chimiques.

Lorsque nous avons effectué nos essais de filtration et de collage, ces vins n'avaient pas encore subi de traitement stabilisateur, à l'exception d'un des deux lots de vin blanc qui a été additionné de bentonite à la dose de 1 g/litre avant le départ de la fermentation. Le produit utilisé est une montmorillonite sodique d'origine américaine. L'analyse par photométrie de flamme de 1 g de bentonite sèche donne une teneur en sodium de 29 mg et en potassium de 7 mg.

Nous avons repris cette même qualité de bentonite pour le collage des vins faits et dans les deux cas, traitement du moût ou traitement du vin, l'incorporation s'effectue sous forme d'une suspension dans l'eau pure, environ 2 litres pour 100 g de bentonite, que nous laissons gonfler pendant 48 heures.

Chaque vin est étudié selon un protocole qui comprend les opérations suivantes :

TABLEAU I

Analyse des différents types de vins étudiés

	Vins blancs témoins	Vins blancs bentonités avec fermentation	Vins rosés non macérés	Vins rosés macérés	Vins rouges
Extrait-sec :					
g/l	15,5	15,1	15,2	17,3	20,8
alcool	12,5	12,3	13,1	12,45	13,1
Acidité totale (g/l (SO_4H_2)) .	4,90	4,70	4,20	3,80	4,01
Acidité volatile (g/l)	0,21	0,12	0,20	0,17	0,35
Sucres (g/l) ...	1,0	1,0	1,0	1,4	1,6
Fer total (mg/l)	8	10	9	8	11
Sodium (mg/l) .	6	23,5	6,5	6	6,5
Potassium (mg/l)	470	445	660	840	860

1° *Prélèvement d'un échantillon moyen*

Le récipient contenant le vin est agité afin de remettre en suspension les lies et le floculat lorsqu'il y a eu collage à la bentonite.

2° *Analyse de l'échantillon homogénéisé*

a) *Pesée de l'extrait sec insoluble* : cette détermination est effectuée sur le résidu séché à 105°C pendant 2 heures provenant soit d'un culot de centrifugation (5 500 t/min), soit d'une filtration sur filtre sans cendres.

b) *Mesure du trouble* : faite à l'aide d'un spectrophotomètre modèle Jean et Constant utilisé sur la longueur d'onde de 650 mμ et avec des cuves d'une épaisseur variant entre 0,5 et 1 cm selon l'intensité du trouble. Les résultats sont exprimés en densités optiques × 100 desquelles on retranche une valeur Δ_0 correspondant à l'absorption de base du vin centrifugé correspondant.

Sur les vins rosés et rouges, nous déterminons en plus, après centrifugation à 5 000 t/min, *l'intensité colorante* (somme des densités optiques à 420 et 520 mμ) et la *nuance* (rapport des même densités), suivant la méthode d'expression proposée et appliquée par SUDRAUD (1958).

c) *Numération des levures en suspension* : à l'aide de la cellule de Thoma, les résultats étant ramenés au nombre de levures par millimètre cube de vin.

d) *Dosage du sodium et du potassium par photométrie de flamme.*

3° *Filtration du vin*

a) *matière filtrante* : nous utilisons des plaques de cellulose-amiante d'origine « Seitz » dont les principales caractéristiques sont données dans le tableau 2. Dans tous les essais, la surface totale de filtration est de 4 000 cm², soit 10 plaques de 0,20 m × 0,20 m et la pression est maintenue constante à 0,600 Kg/cm2.

b) *Mesure du débit* : le filtrat est recueilli sous forme de fractions qui sont elles-mêmes collectées à des intervalles de temps réguliers, variant d'un essai à l'autre d'une demi-minute à deux minutes, selon l'intensité du trouble du vin traité et selon le degré de porosité de la plaque mise en œuvre.

Il suffit ensuite de mesurer le volume de chaque fraction pour connaître les variations de la vitesse d'écoulement au cours du filtrage.

TABLEAU 2

Caractéristiques des plaques filtrantes utilisées

Désignation des plaques	Degré de porosité	Pouvoir filtrant	Pourcentage de cellulose	Pourcentage d'amiante
Plaques clarifiantes				
	3	fin	81,5	18,5
« K »	5	très fin	76	24
	7	très fin	72	28
Plaques stérilisantes				
« EK »		très fin	66	34
Plaques spéciales				
« AS »		très fin		
« SSK		très fin		

Dans le cas des vins rouges et rosés, on recueille un peu de liquide à la fin de chaque fraction, et c'est sur quelques cm^3 et non sur la totalité de la fraction collectée, que sont effectuées les mesures se rapportant à la couleur, après centrifugation.

4° *Analyse des différentes fractions du filtrat*

Chacune des fractions recueillies au cours d'un essai est homogénéisée, puis soumise aux mêmes analyses que l'échantillon moyen de vin avant filtration (cf. § 2).

5° *Expression des résultats*

La plupart des résultats sont donnés sous forme de graphiques, dont les principaux représentent :

— le volume écoulé en fonction du temps pour les différents types de vins et les différentes plaques filtrantes mises en œuvre ;
— l'évolution du trouble au cours de la filtration ;
— la corrélation entre l'intensité du trouble et le nombre de levures en suspension ;
— l'évolution de la couleur exprimée par un pourcentage de pertes.

III. — EXPÉRIMENTATION SUR LES VINS BLANCS

Le but de cette expérimentation était de chercher à savoir l'intérêt pratique que pouvait présenter un traitement des moûts à la bentonite en vue d'une clarification rapide des vins jeunes par filtration. Les résultats déjà signalés par quelques auteurs ayant prouvé que la bentonite ainsi utilisée n'entraîne pas le colmatage

très rapide des filtres, phénomène bien connu dans le cas des collages précédant de peu la filtration des vins faits, nous avons tenu à vérifier nous-mêmes l'effet de tels traitements comparatifs sur des vins de même composition en mettant en œuvre la même qualité d'argile.

A — *Influence d'un traitement des moûts à la bentonite sur la filtration des vins jeunes*

Les différentes expériences rapportées dans ce paragraphe permettent de comparer, à la fois du point de vue rendement et efficacité, la filtration des vins blancs bentonités à la dose de 1 g/l avant fermentation et la filtration de vins blancs témoins non traités et de même origine.

Cette comparaison a d'abord été établie sur des plaques de différentes porosités, puis sur des plaques de même porosité « K_5 », ces dernières correspondant particulièrement bien aux besoins du praticien qui aurait à traiter les vins que nous avons étudiés et dont les caractéristiques de trouble sont données dans le tableau 3.

TABLEAU 3

Caractéristiques des troubles des vins blancs

Nature des vins	Numéro d'expérimentation	Intensité du trouble D.O. × 100	Nombre de levures/mm³	Extrait-sec insoluble (g/l)
Vins blancs témoins	1	128	44 000	0,720
	2	175,5	59 200	0,832
Vins blancs bentonités avant fermentation	1	89,5	22 000	0,644
	2	175	56 800	0,750
Vins blancs bentonités après fermentation		192	48 000	1,032

a) *Filtration sur plaques de différentes porosités.*

Les vins mis en œuvre dans cette série de filtrations sont désignés par le numéro 1 (cf. tabl. 3). Si l'on compare les figures 1 et 2 qui représentent le volume écoulé en fonction du temps, respectivement pour les vins témoins, et pour les vins bentonités, nous constatons que le débit est légèrement plus important pour les premiers sur les plaques de grande porosité (K_3). Ainsi, avec ce type de plaque, 75 litres de vin s'écoulent en 219 secondes en l'absence de bentonite et en 246 secondes en sa présence.

Au contraire, sur des plaques plus fines, (K_5) par exemple, nous constatons le phénomène inverse : le vin non bentonité s'écoule avec un débit nettement plus faible que le vin bentonité (75 litres en 228 secondes contre 75 litres en 192 secondes seulement). Autrement dit, le colmatage est plus important avec le premier qu'avec le second, malgré la présence de bentonite dans celui-ci, qui, comme nous l'avons

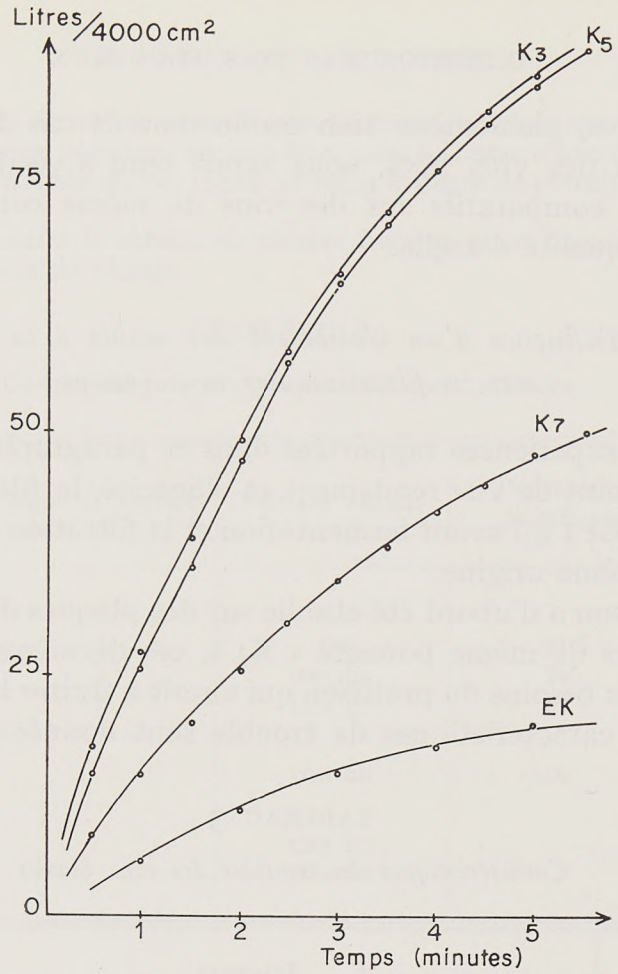


FIG. 1. — *Vitesses d'écoulement, en fonction du temps, des vins blancs témoins sur plaques filtrantes de différentes porosités*

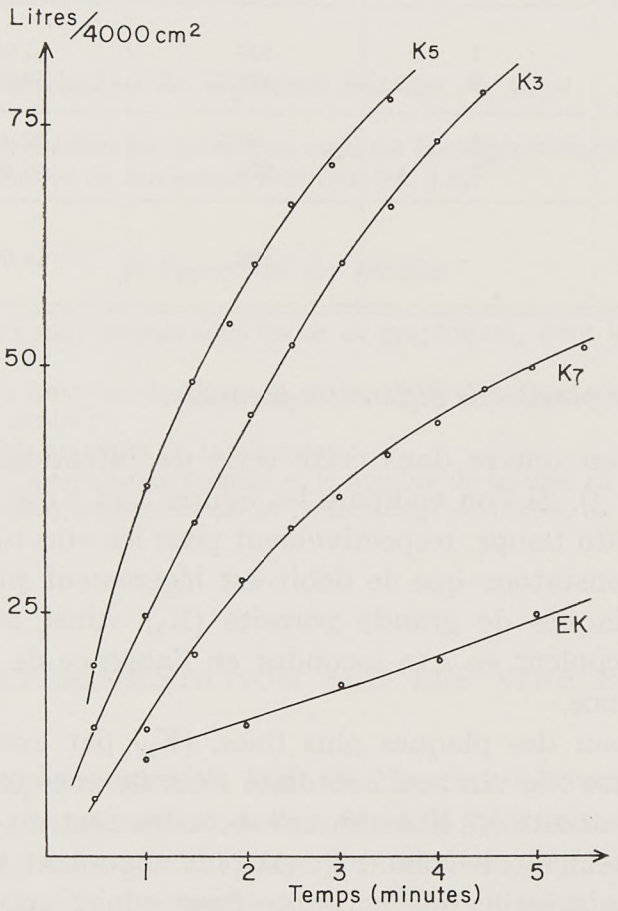


FIG. 2. — *Vitesses d'écoulement, en fonction du temps, des vins blancs bentonités à l'état de moûts sur plaques filtrantes de différentes porosités*

dit dans l'exposé des techniques expérimentales, est remise en suspension avec les lies immédiatement avant de commencer à filtrer.

Notons que la diminution de porosité de la masse filtrante — passage des plaques K_3 aux plaques K_5 — n'a pas fait varier le débit dans le même sens pour les vins témoins et pour les vins bentonités. Avec les premiers, le débit a légèrement

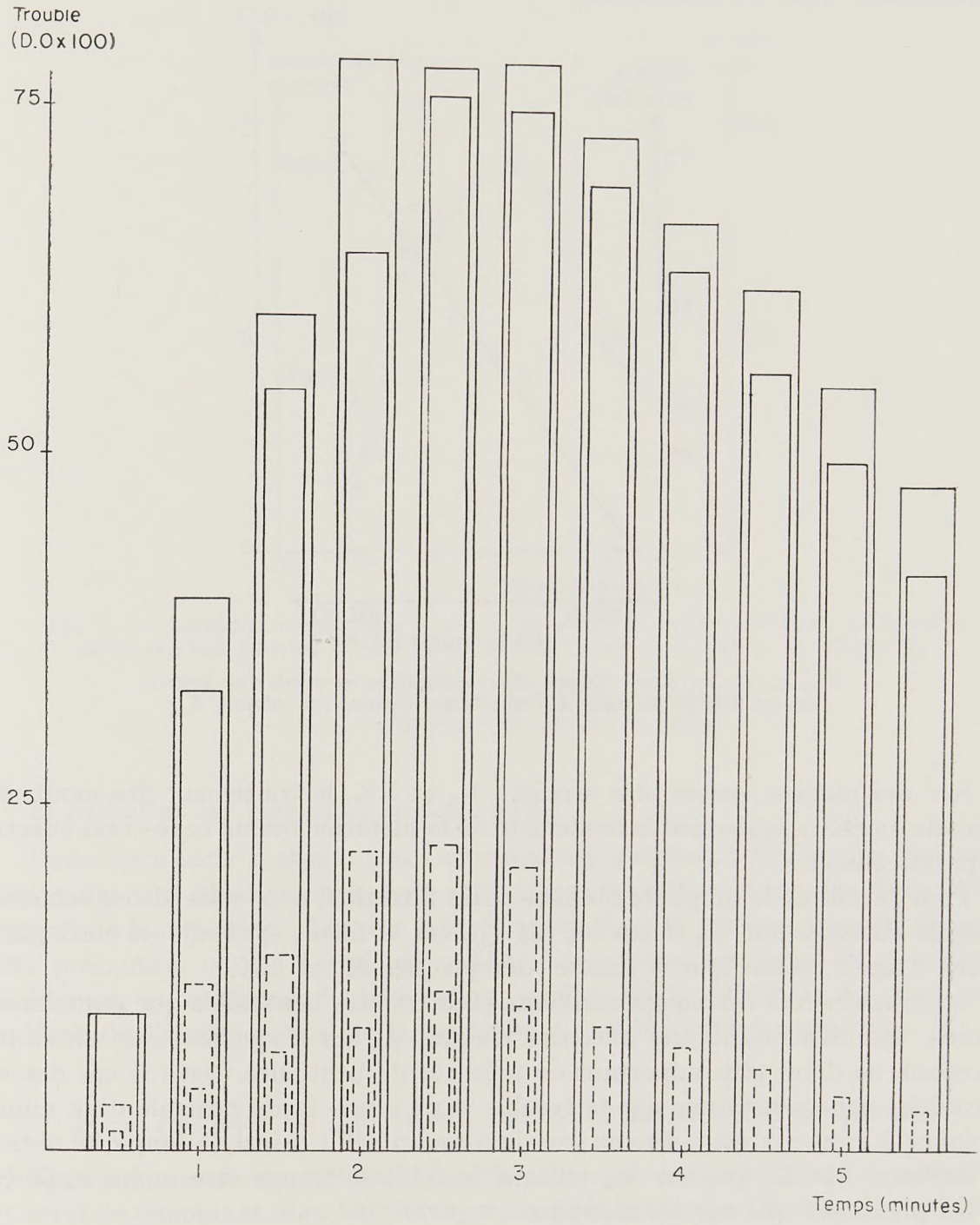


FIG. 3. — *Évolution des troubles au cours de la filtration des vins blancs témoins et des vins blancs bentonités à l'état de moûts sur plaques filtrantes de porosité (K_3) et de porosité (K_5)*

Filtration des vins témoins sur K_3

Filtration des vins témoins sur K_5

Filtration des vins bentonités sur K_5

Filtration des vins bentonités sur K_3

baissé, ce qui est logique, alors qu'avec les seconds, il a au contraire augmenté d'une façon très nette. Cette dernière observation que nous avons d'abord cru devoir attribuer à une faute d'expérimentation (augmentation de la pression par exemple), s'est confirmée chaque fois que nous avons eu à filtrer un vin dont le trouble était constitué par un mélange de levures et de bentonite. Nous essaierons d'expliquer ce phénomène dans les conclusions.

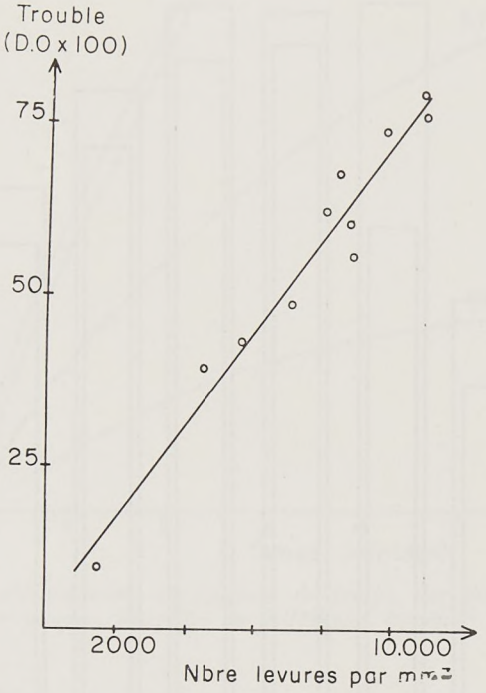


FIG. 4. — *Corrélation obtenue entre le trouble et le nombre de levures au cours de la filtration des vins blancs témoins sur plaques K_3*

Sur des plaques encore plus serrées : K_7 et EK, le traitement des moûts à la bentonite améliora également le rendement de la filtration quand celle-ci est effectuée comparativement.

Pour l'étude de la limpidité obtenue après filtration, nous retiendrons seulement les essais effectués sur K_3 et sur K_5 (fig. 3), car le filtrat est toujours sorti parfaitement limpide, d'un bout à l'autre, des plaques K_7 et EK.

La limpidité est nettement meilleure pour les vins bentonités que pour les vins témoins, ceci demeurant vrai avec des plaques K_5 sur lesquelles nous avons noté cependant un débit plus important en présence de bentonite. Dans le cas des vins bentonités, nous constatons que le trouble varie d'une façon normale d'un numéro de plaque à l'autre, c'est-à-dire en sens inverse du débit. Ainsi, la limpidité obtenue est meilleure sur K_3 que sur K_5, puisque le débit se trouve être moins important sur les premières que sur les secondes.

Pour les deux types de vins étudiés, bentonités ou non, la filtration se fait d'abord par adsorption, puis par tamisage. L'intensité du trouble passe par un maximum qui se situe entre deux et trois minutes après le début de l'opération. Ce trouble résiduel est constitué par des levures, comme le prouve la figure 4 qui donne un exemple de la corrélation existant entre la mesure du trouble dans les différentes fractions recueillies et le nombre de levures par mm^3.

Pour les vins bentonités, nous avons voulu nous assurer qu'il n'y avait pas passage de bentonite dans le filtrat et dans ce but, nous avons établi une corrélation, non seulement entre le trouble et le nombre de levures, mais également avec l'extrait sec insoluble. C'est ce que représente la figure 5.

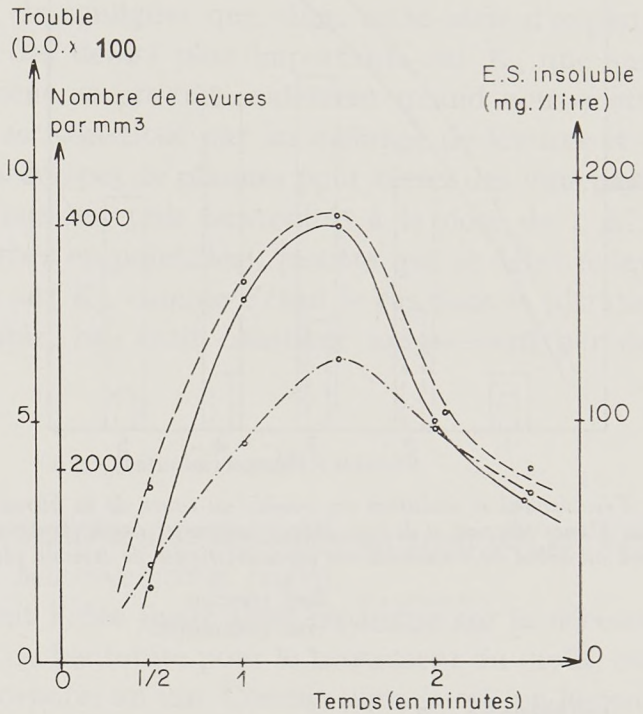


FIG. 5. — *Corrélation obtenue entre le trouble, le nombre de levures et l'extrait sec insoluble au cours d'une filtration de vins blancs bentonités avant fermentation, sur plaques* K_5

——— Évolution du trouble.
– – – – – – – – Évolution de l'extrait-sec insoluble
—·—·—·— Évolution du nombre de levures

b) *Filtration sur plaques de porosité 5* (K_5).

Dans cette série d'essais, nous nous sommes attachés à choisir des vins bentonités et des vins témoins présentant exactement les mêmes intensités de trouble au moment de la filtration. Ces vins sont désignés dans le tableau 3 par le numéro 2. Cette précaution nous a permis de vérifier d'une façon rigoureuse les observations précédentes, et confirmer l'amélioration sensible de la filtration des vins jeunes résultant de l'incorporation de la bentonite au moût avant fermentation (fig. 6).

B — *Filtration de vins jeunes précédée d'un collage à la bentonite*

Nous reprenons les mêmes types de vins que ceux qui jusqu'à maintenant ont servi de témoins et nous leur incorporons de la bentonite à la dose de 1 g/l immédiatement avant de les filtrer, ceci tout en veillant soigneusement à ce que les caractéristiques finales du trouble, soient toujours comparables à celles des vins étudiés précédemment (tabl. 3). La bentonite est mise à gonfler dans de l'eau pure.

La figure 7 (courbes en traits pleins) montre que les filtres se colmatent très rapidement, les vitesses d'écoulement n'étant absolument pas comparables avec celles qui ont été chiffrées, sur les mêmes plaques, dans les expériences précédentes.

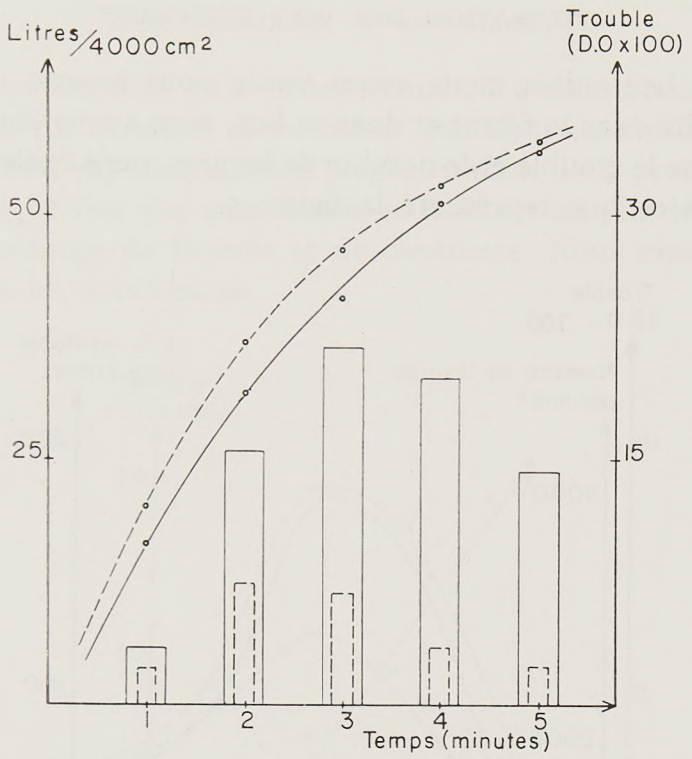


FIG. 6. — *Vitesse d'écoulement et évolution du trouble au cours de la filtration sur plaques K_5 de vins blancs témoins et de vins blancs bentonités avant fermentation, présentant au début du traitement des caractéristiques de trouble identiques*

—·—·—·— vins témoins
– – – – – – – – vins bentonités.

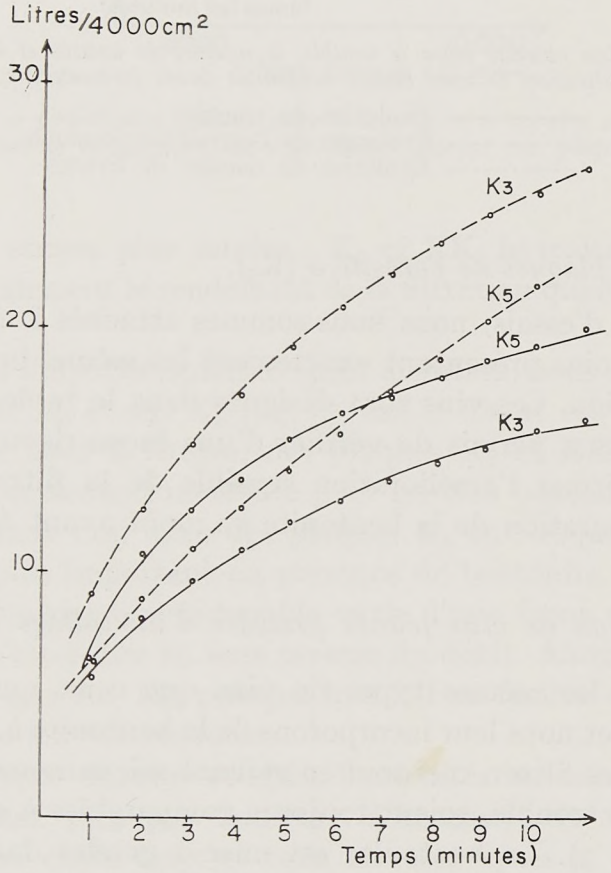


FIG. 7. — *Vitesse d'écoulement en fonction du temps sur plaques K_3 et K_5 de vins blancs bentonités après fermentation, avec ou sans levures en suspension*

———— vins contenant des levures.
– – – – – – – – vins ne renfermant pas de levures.

En revanche, la limpidité du filtrat est parfaite ; sa mesure en densité optique correspond à l'absorption de base d'un échantillon du vin centrifugé. Autrement dit, la bentonite fraîchement incorporée au vin a un pouvoir colmatant beaucoup plus important que lorsqu'elle est introduite dans le moût et que la filtration a lieu plusieurs semaines après l'incorporation.

Il est important de souligner que, dans cette série d'expériences, nous avons, de nouveau, obtenu des débits plus importants sur K_5 que sur K_3. Cherchant à vérifier si ce phénomène se produit seulement quand nous mettons en œuvre des vins dont le trouble est constitué par un mélange de levures et de bentonite, nous avons utilisé les mêmes types de plaques pour filtrer des vins passés d'abord sur K_7, donc parfaitement limpides, puis bentonités à la dose de 1 g/l.

La figure 7 (courbes en pointillés), montre que le débit redevient normalement plus élevé sur K_3 que sur K_5, comme c'était le cas dans la filtration des vins témoins (fig. 1), dont le trouble, lui, était constitué uniquement par des levures.

C — *Discussion*

Les avantages de l'addition de bentonite au moût ont été exposés, comme nous l'avons déjà dit, par Milisavljevic (1963).

Cet auteur combat l'idée jusqu'alors répandue sur la nécessité d'employer une plus grande quantité de bentonite pour le traitement du moût, comparée à celle que l'on est amené à incorporer au vin. Comme nous avons pu le constater nous-mêmes 100 g de bentonite/hecto, gonflée dans l'eau pure, sont suffisants si on les ajoute au moût avant le départ de la fermentation.

Par ailleurs, Milisavljevic observe que pour la même dose de bentonite employée dans les deux cas, le volume de lie qui se dépose est de 40 à 50 p. 100 moins important dans le premier que dans le second.

Bien entendu, le praticien ne remet pas les lies en suspension, mais il est amené à puiser dans une zone intermédiaire beaucoup moins importante en volume que celle qui résulte d'un bentonitage précédant de peu la filtration du vin. De plus, nous avons constaté qu'à troubles égaux, le contenu de cette zone se filtre plus facilement.

Retenons par ailleurs que dans la filtration des vins jeunes bentonités, dont le trouble est constitué essentiellement par un mélange de levures et d'argile en suspension, le colmatage est moins important sur des plaques renfermant un assez fort pourcentage d'amiante, que sur des plaques plus riches en cellulose.

Cette observation est liée certainement aux phénomènes d'adsorption existant entre la cellulose qui possède une charge électrostatique positive, et les particules d'argile qui sont chargées d'électricité négative. Geiss (1963) parlant de la très forte influence des substances colloïdales sur la filtration, souligne que celles-ci parviennent à pénétrer dans la masse et à y former une sorte de pont, en prenant appui de part et d'autre des pores.

Ainsi, dans le cadre de nos essais, nous pouvons supposer que la bentonite est adsorbée de part et d'autre des pores par la cellulose et que les levures sont retenues par tamisage lorsqu'elles se présentent face à ces ponts. Il est logique de penser que l'enchevêtrement des particules de bentonite sera d'autant plus important,

d'autant plus serré, que la plaque filtrante renfermera une quantité plus grande de cellulose. Il en sera de même pour l'effet du tamisage dû à l'accumulation des levures.

IV. — EXPÉRIMENTATION SUR LES VINS ROSÉS ET SUR LES VINS ROUGES

Dans cette partie de notre étude, nous avons poursuivi des mesures de débit et de limpidité au cours de la filtration sur des plaques de cellulose-amiante, ceci dans le but de vérifier les résultats que nous avons obtenus dans notre expérimentation sur les vins blancs. Par exemple, nous avons eu la confirmation qu'il existe une relation caractéristique entre le débit, la nature du trouble des vins traités (levures seules ou levures plus bentonite) et la composition de la masse filtrante (pourcentage d'amiante plus ou moins élevé).

Nous ne rapporterons ici qu'un type d'essai qui n'a pas été effectué sur les vins blancs et dans lequel nous filtrons en présence de Kieselguhr. Nous aborderons ensuite l'objet proprement dit de cette expérimentation sur les vins rosés et rouges qui est l'étude de l'action de quelques facteurs de clarification sur la robe des vins de primeur :

influence des matières filtrantes à base de cellulose-amiante,
influence du Kieselguhr,
influence de l'addition de bentonite.

A — *Utilisation du Kieselguhr. Influence sur le débit et la finesse de filtration*

La terre d'infusoires ou Kieselguhr est mise en œuvre de deux façons différentes : soit par l'utilisation de plaques « spéciales » qui en contiennent un certain pourcentage incorporé aux deux matières traditionnelles (AS et SSK-Seitz), soit par addition au vin à la dose de 0,5 g/l, suivie d'un passage sur K_3.

Nous reproduisons (fig. 8) un essai réalisé sur des vins rosés macérés dont les caractéristiques sont données dans le tableau 4.

Du point de vue rendement, nous constatons que la présence de Kieselguhr dans la masse filtrante ou dans le vin permet d'obtenir des débits qui sont intermédiaires, pour le même vin traité, entre ceux obtenus sur plaques K_5 et K_7. Du point de vue efficacité, le Kieselguhr employé dans les conditions que nous avons définies plus haut a donné, dans tous nos essais, des filtrats d'une limpidité parfaite, analogue à celle obtenue par passage sur plaques de cellulose-amiante très serrées, telles K_7.

Dans notre exemple, la mesure exprimée en densité optique de cette limpidité correspond à l'absorption de base d'un échantillon de vin centrifugé (D.O. $\times$ 100 = 7) et le nombre de levures restées en suspension est négligeable (de l'ordre de 200 par mm^3). En revanche, le filtrat recueilli sur K_5 présente un trouble résiduel d'intensité (= 15) qui contient encore 2 500 levures au mm^3.

Si nous transposons cet exemple dans la pratique courante du chai, nous constatons que la clarification de ce vin rosé dont le trouble est tout à fait normal pour son type et son âge, est rendue parfaitement possible en une seule opération grâce

TABLEAU 4

Caractéristiques des troubles des vins rosés et des vins rouges

Nature du vin	Intensité du trouble (D.O. × 100)	Nombre de levures (mm³)	Extrait-sec insoluble (g/l
Rosé macéré...	172	37 750	1,25
Rosé non macéré	154	35 000	0,92
Rouge	49	14 500	0,54

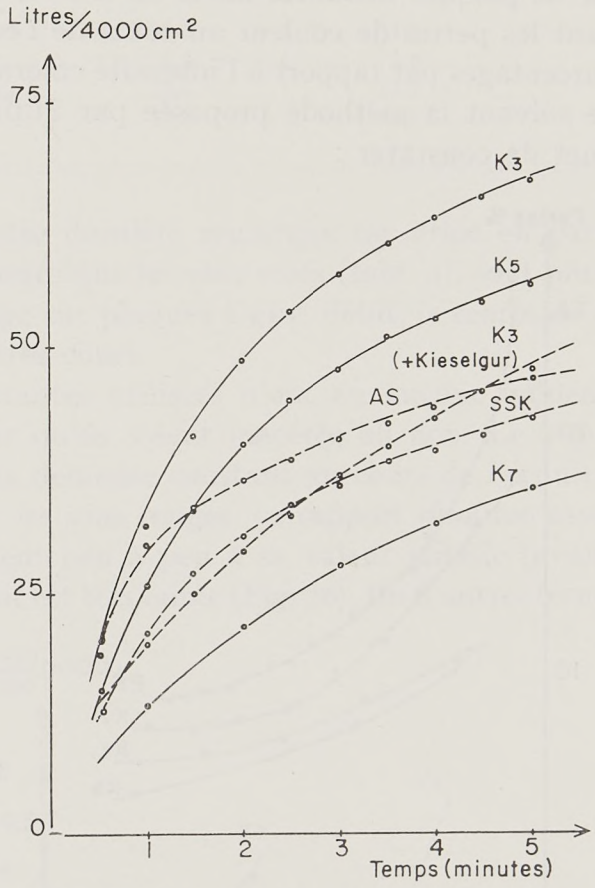


FIG. 8. — *Influence du Kieselguhr sur le débit et la finesse de filtration (vins rosés macérés)*
——— (sans kieselguhr).
– – – – – – – – (avec kieselguhr).

à l'emploi de Kieselguhr. Par contre, les plaques ordinaires de cellulose-amiante mises à la disposition du vigneron, sont dans ce cas, trop lâches à l'exemple des plaques K_5 qui laissent un trouble résiduel nécessitant un deuxième passage du vin sur plaques plus serrées, voire trop fines telles K_7 qui se colmatent trop rapidement pour être utilisées d'une façon pratique.

En ce qui concerne les différents modes possibles d'utilisation du Kieselguhr, notons que l'emploi de plaques spéciales, telles que celles que nous avons expérimentées, est une solution très valable. Elle décharge l'opérateur de beaucoup de travail et paraît lui assurer plus de sécurité quant au résultat obtenu ; de plus, elle ne nécessite par l'achat d'un appareillage coûteux.

En revanche, nos essais semblent montrer que, pour une même finesse de filtration, le colmatage est plus important sur les plaques contenant du Kieselguhr que par addition de produit au vin et passage ensuite sur plaques à forts débits (K_3). Bien entendu, la technique de l'alluvionnage continu, lorsque l'achat du matériel nécessaire se justifie, améliore encore le rendement.

B — *Étude de l'action de quelques facteurs de clarification sur la robe des vins de primeur*

a) *Influence des matières filtrantes à base de cellulose-amiante.*

Pour chaque type de plaques filtrantes mises en œuvre, nous avons établi des graphiques représentant les pertes de couleur au cours de l'écoulement. Ces pertes sont exprimées en pourcentages par rapport à l'intensité colorante du vin non traité, elle-même déterminée suivant la méthode proposée par SUDRAUD.

La figure 9 permet de constater :

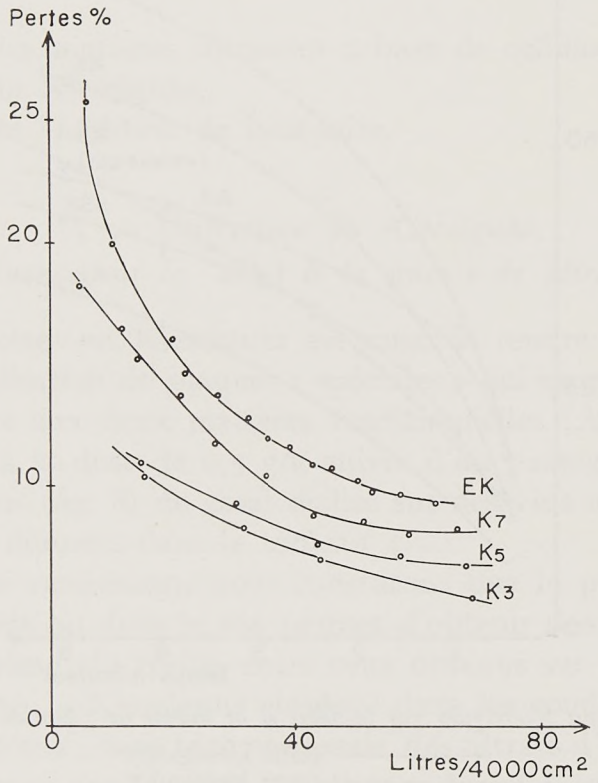


FIG. 9. — *Évolution de l'intensité colorante des vins rouges au cours de leurs écoulement sur des plaques de cellulose-amiante de degrés de porosité croissante*

— d'une part, que les pertes globales de l'intensité colorante sont proportionnelles au temps de contact avec la masse filtrante, c'est-à-dire à sa finesse, donc inversement proportionnelles au débit ;

— d'autre part, que les pertes sont surtout importantes au début de l'opération.

Il s'agit donc principalement d'une adsorption des pigments par les fibres de cellulose, adsorption qui décroît au fur et à mesure que le processus de tamisage devient prépondérant.

Dans le cas des vins étudiés, la limpidité parfaite pouvant être obtenue, soit par passage direct sur K_7, soit par un filtrage sur K_3 suivi d'un second sur K_5, cette dernière façon d'opérer nous semble être avantageuse. En accroissant le débit, elle permet en effet de réduire l'importance des pertes (tabl. 5).

TABLEAU 5

Comparaison des pertes de couleur par passages successifs sur K_3 et K_5 ou par passage direct sur K_7

Procédé de filtration	Pertes en p. 100		
	Rosé macéré	Rosé non macéré	Rouge
K_3	9,3	11,3	7,3
K_3/K_5	4,1	1,8	1,5
$K_3 + K_3/K_5$ ..	13,4	13,1	8,8
K_7	13,8	13,6	13,1

Précisons que cette dernière remarque est vraie en particulier pour les vins rouges qui, moins chargés que les vins rosés (tabl. 4), sont plus faiblement décolorés que ceux-ci par passage sur plaques à gros débit, le temps de contact avec la masse filtrante étant alors très court.

Les matières filtrantes utilisées n'ont eu aucune influence sur la nuance des vins rosés de primeur qu'ils soient macérés ou non. Le rapport des absorptions à 420 mμ et à 520 mμ demeure constant au cours de l'écoulement.

Par contre, pour les vins rouges, ce rapport diminue assez fortement au début puis s'inverse et revient peu à peu à sa valeur initiale (avant filtration), voire la dépasse lorsque le débit est très faible (Fig. 10). En d'autres termes, on observe d'abord

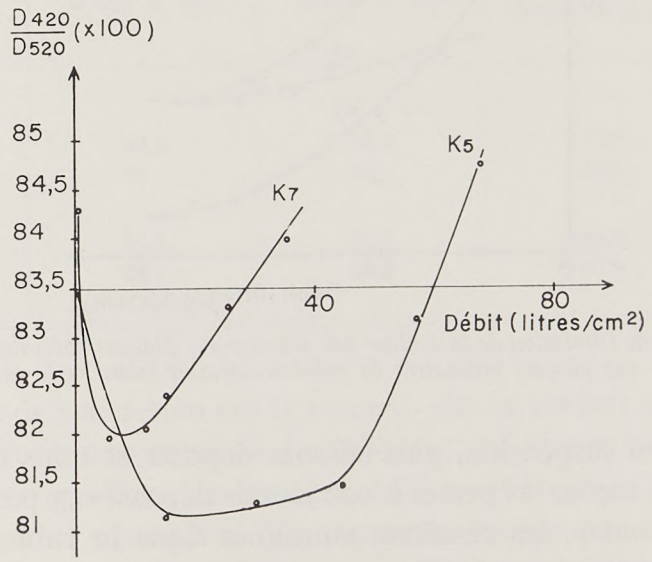


FIG. 10. — *Évolution de la nuance des vins rouges au cours de leur passage sur plaques K_5 et K_7*

un avivement de la couleur dans la première fraction, conséquence de la fixation des pigments jaunes, puis, petit à petit, un jaunissement qui s'accentue dans les dernières. En définitive, le lot homogénéisé est sensiblement plus sombre après passage sur plaques serrées tandis que sa nuance s'avive légèrement après passage sur plaques à gros débit.

b) *Influence du Kieselguhr.*

Une expérience simple nous a permis de vérifier que la terre d'infusoires n'avait par elle-même aucune influence sur la couleur : connaissant l'intensité colorante d'un échantillon non traité, nous lui ajoutons une quantité de Kieselguhr de 0,5 g/l

TABLEAU 6

Comparaison des pertes de couleur selon le mode d'utilisation du Kieselguhr (plaques spéciales ou addition au vin)

Nature du vin	Pertes en p. 100		
	AS	SSK	Addition de K
Rosé macéré ..	11,5	14,1	9,6
Rouge	13,1	15,9	7,5

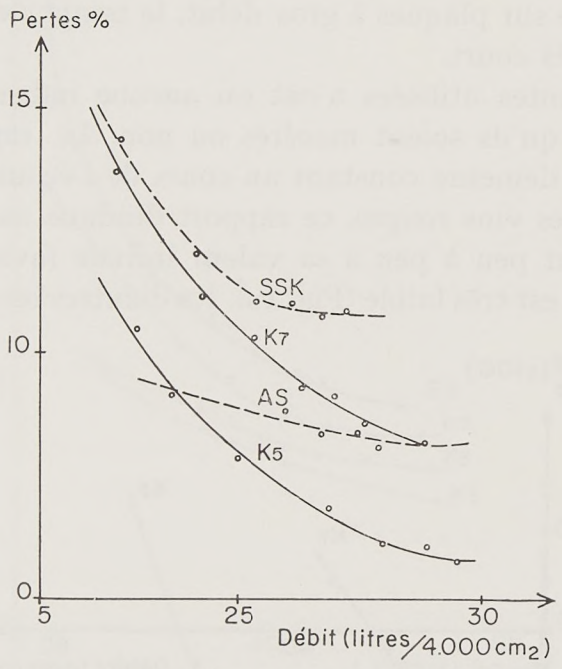


FIG. 11. — *Comparaison de l'évolution de la couleur par passage sur plaques spéciales renfermant du kieselguhr et sur des plaques ordinaires de cellulose-amiante (vins rosés macérés)*

que nous mettons en suspension, puis laissons déposer et nous mesurons à nouveau l'intensité. De cette façon, les pertes n'ont jamais dépassé 0,3 p. 100 ; elles sont donc négligeables. Par contre, les résultats consignés dans le tableau 6 montrent que les pertes sont plus élevées par filtration sur des plaques spéciales renfermant du

Kieselguhr que par addition de celui-ci au vin à raison de 0,5 g/l puis passage sur plaques K_3. Rappelons que pour les vins mis en œuvre, ces deux techniques permettent d'obtenir une limpidité parfaite, mais nous avons signalé un colmatage plus important, donc un temps de contact plus long dans la première que dans la seconde.

Par ailleurs, nous avons comparé l'évolution de la couleur du vin au cours de son écoulement sur plaques spéciales AS et SSK d'une part et sur les plaques ordinaires de cellulose-amiante K_5 et K_7 d'autre part. D'après la figure 11, nous constatons que sur les premières, l'évolution de l'intensité se stabilise assez rapidement. Les fortes pertes constatées au début de l'opération sur K_5 et K_7 sont ici moins importantes à cause de l'incorporation de Kieselguhr et d'une prédominance très rapide du processus de tamisage sur celui de l'adsorption. Aucune influence de la terre d'infusoires sur la nuance n'a pu être mise en évidence.

c) *Influence de l'addition de bentonite au vin.*

Nous insisterons surtout sur la différence existant entre les rosés macérés et les rosés non macérés quant à l'action de la bentonite sur leur robe. Refaisant la même expérience que celle effectuée avec le Kieselguhr pour pouvoir apprécier son influence sur la couleur, nous constatons qu'une addition de bentonite de 0,5 g/l entraîne des pertes de 15 p. 100 en moyenne pour les macérés et de 26 p. 100 pour les non macérés, soit une variation du simple au double (en l'absence de filtration). Si maintenant, nous éliminons la bentonite par passage sur K_3, aux pourcentages de pertes importants déjà chiffrés, viennent s'ajouter encore 13 p. 100 pour les macérés et 11 p. 100 pour les non macérés. Le traitement étant terminé, l'intensité aura donc baissé en tout de 28 p. 100 pour les premiers vins et de 37 p. 100 pour les seconds. Ces pertes sont inacceptables dans la pratique.

TABLEAU 7

Influence de la bentonite sur les caractéristiques de la robe des vins rosés non macérés et vins rosés macérés

Nature du vin	D.420 × 100	D.520 × 100	Intensité D.420 + D.520	Nuance D.420/D.520
Rosé non macéré				
avant bentonitage	35,2	38,5	73,7	0,91
après bentonitage	28	26,4	54,4	1,06
Rosé macéré				
avant bentonitage	55,1	54,5	109,6	1,01
après bentonitage	48,5	44,3	92,8	1,09

Pour ce qui est de son action sur la nuance, elle se traduit par un jaunissement caractéristique des rosés non macérés. Le tableau 7 qui donne un exemple des résultats obtenus, montre en effet que les pertes d'intensité subies par ces vins correspondent surtout à une adsorption des pigments rouges par la bentonite. Ainsi, l'absorption à 420 mμ, exprimée en D.O. × 100, diminue de 7,2 unités seulement,

alors que l'absorption à 520 mμ baisse de 12,1 unités : le rapport D 420/D 520 passant de la valeur 0,91 à la valeur 1,06.

Notons que la même addition de bentonite à raison de 0,5 g/l affecte beaucoup moins la nuance des vins rosés macérés.

C — *Discussion*

1° L'expérimentation qui vient d'être rapportée sur la clarification des vins nouveaux, rosés et rouges, a d'abord permis de mettre en évidence les avantages procurés par l'utilisation du Kieselguhr dans la filtration. Tout en améliorant le débit et la limpidité, la terre d'infusoires conserve au mieux les caractéristiques de la robe puisqu'elle n'a par elle-même aucune action sur l'intensité, ni sur la nuance.

2° Par contre, nous avons pu vérifier à nouveau que la bentonite affecte très fortement la couleur, tout particulièrement dans le cas des vins rosés non macérés. Sans aucun doute, la technique de macération, même de courte durée, provoque l'extraction et la diffusion de pigments anthocyaniques non seulement en quantité plus importante, mais qui paraissent plus stables lorsque les vins sont soumis ultérieurement à des traitements physiques.

3° Nous pouvons conclure en disant que, d'une façon générale la filtration amenuise la couleur. On a toujours intérêt à éviter de prolonger le contact du liquide avec la matière filtrante. Ainsi, pour les vins jeunes dont le trouble est toujours élevé, il est avantageux de les filtrer en deux opérations successives afin d'accroître le débit et, par voie de conséquence, de réduire les pertes.

V. — CONCLUSIONS GÉNÉRALES

La présente étude a envisagé quelques solutions pratiques de clarification rapide des vins jeunes en associant à la filtration l'addition de bentonite ou celle de Kieselguhr.

Pour les vins blancs, l'addition de bentonite au moût a donné entière satisfaction. Elle permet d'effectuer une filtration avec un rendement et une efficacité accrus dans les tout premiers mois qui suivent l'élaboration. Par ailleurs, précisons que le bentonitage des moûts n'a eu aucune influence néfaste sur la qualité organoleptique, le vin traité étant identique à la dégustation au vin non traité. Du point de vue aspect, le vin blanc bentonité présente plus de « brillant » que le vin témoin. Seule, une légère modification de la composition minérale peut être imputée au traitement : on constate un enrichissement du vin fait en sodium de l'ordre de 15 mg/l et son appauvrissement en potassium de l'ordre de 25 à 30 mg/l.

Pour les vins rouges et rosés, il nous paraît important, comme nous l'avons déjà fait (J. BERGERET, 1963), de mettre en garde le praticien sur les conséquences des collages à la bentonite qui se traduisent toujours par un appauvrissement de la robe, tout particulièrement celle des rosés non ou peu macérés.

L'expérimentation rapportée aujourd'hui nous a permis de chiffrer avec précision l'importance des pertes de couleur ainsi que l'évolution de la nuance, ce qui

met en relief le caractère particulièrement instable de certains pigments que contiennent les vins jeunes. Quel que soit le procédé de filtration mis en œuvre, avec ou sans adjuvant, le vin sort du filtre sensiblement modifié dans ses caractères apparents, robe et saveur. Sur cette dernière, il ne nous est pas possible de faire état de notes en l'absence de critères sur lesquels tout le monde soit d'accord. Mais chacun sait que le vin fait sa « maladie de bouteille » ; il convient aussi de parler d'une « maladie de filtration ».

Il est bien évident que l'un des buts à atteindre est le respect de l'intégrité du produit, autant que faire se peut, avec le souci de le présenter au consommateur sous le meilleur aspect possible. Mais n'oublions pas que le consommateur est quelquefois conservateur. Donc, la stabilisation ne doit pas être éphémère ; le stockage des vins considérés hâtivement comme parfaitement stabilisés réserve bien souvent des surprises.

Reçu pour publication en juillet 1965.

SUMMARY

A STUDY OF SOME FACTORS AFFECTING THE FILTRATION OF NEW WINES

In attempting to stabilise young wines (only 2 to 4 months old), which are cloudy and comprised essentially of yeasts in suspension, the authors have experimented with several processes which might facilitate filtration on plates consisting of a mixture of cellulose and asbestos. Care was taken to respect the organoleptic characteristics of these new wines.

The measurements of flow and the expression of limpidity given graphically in the text show that an addition of bentonite to the must in a 1 g/l dose before fermentation is a solution worth retaining for the clarification of white wines. Yield and efficiency are increased without the qualities of the treated wines being much affected, the appearance being even improved. On the other hand, it is preferable to filter red and « rosé » wines earlier using Kieselguhr than when using bentonite (if a treatment with the latter is not indispensable) since bentonite invariably impoverishes the skin.

In general, in order to restrict colour losses and yellowing, the duration of contact of the wine with the filter must be kept to a minimum. Moreover, the direct passage of young, still very cloudy wines through condensed plates rich in asbestos is unadvisable.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BERGERET J., 1963 *a*. Action de la gélatine et de la bentonite sur la couleur et l'astringence de quelques vins. *Ann. Technol. agric.*, **12** (1), 15-25.

BERGERET J., 1963 *b*. La Robe du Vin. Congrès de l'Union nationale desŒnologues, Dijon. *Bull. Union nation. Œnol.*, n° 11, 10.

BERGERET J., 1963 *c*. Influence des collages et des filtrages sur la couleur des vins. Symp. Int. d'œnologie, Bordeaux. *Ann. Technol. agric.*, **12**, n° hors série, 262.

GEISS W. W., 1963. La filtration des vins. Symp. inter. d'Œnologie, Bordeaux. *Ann. Technol. agric.*, **12**, n° hors série, 205.

MILISAVIJEVIC D., 1963. Prévention des troubles protéiques du vin par l'emploi de bentonite dans le moût. Symp. Int. d'Œnologie, Bordeaux. *Ann. Techol. agric.*, **12**, n° hors série, 315.

PEYNAUD E., SUDRAUD P., 1964. Problèmes de clarification des vins de Bordeaux. *Bull. Union nation. Œnol.*, n° 16, 19.

RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., 1961. Traité d'Œnologie, t. II.

SUDRAUD P., 1958. Interprétation des courbes d'absorption des vins rouges. *Ann. Technol. agric.*, **2**, 203.

Ann. Technol. agric., 1966, **15** (1), 99-111

ÉTUDE DE LA CROISSANCE ANAÉROBIE DES LEVURES AU COURS DE VINIFICATIONS PAR MACÉRATION DE RAISINS ENTIERS

J. CHAUVET, P. BRÉCHOT, Madeleine CROSON et R. IRRMANN

Cuvage Chauvet Frères et Cie, la Chapelle-de-Guinchay, (Saône et Loire)
Laboratoire des Levures de l'Institut Pasteur, Paris,
Laboratoire des Éts Loron et Fils, S. A., Pontanevaux (Saône et Loire)

I. — SOMMAIRE

Les auteurs ont mesuré pendant 4 années consécutives la croissance levurienne au cours d'une vinification traditionnelle beaujolaise ou d'une vinification par macération carbonique.

Certaines conditions de cette croissance ont été étudiées : l'absence d'oxygène dissous pose le problème de la présence de facteurs de croissance anaérobie dans les moûts.

II. — INTRODUCTION

Au cours de vinifications antérieures il était apparu que la vinification par macération carbonique n'entraînait pas une déficience de l'activité levurienne. Cette observation nous a incités à essayer de connaître l'importance de la population levurienne, apparaissant dans ces conditions d'anaérobiose apparente ou tout au moins d'aérobiose très limitée.

Il est classique en œnologie de préconiser l'aération du moût en vue d'augmenter le nombre de cellules, cette richesse cellulaire étant considérée comme un facteur de réussite de l'achèvement de la fermentation (Ribéreau-Gayon, Peynaud, 1960) ; c'est au cours de la phase logarithmique de croissance de la levure qu'il est conseillé de pratiquer cette aération pour obtenir la densité cellulaire maximale (Ribéreau-Gayon, Peynaud, 1960).

D'autre part, depuis une dizaine d'années il a été montré qu'il était possible de développer les levures en anaérobiose stricte, dans certaines conditions. Les expériences ont été faites sur une levure de boulangerie, *Sacch. cerevisiae* : la culture se fait sous azote en présence de stérols, d'acides gras non saturés de poids moléculaire élevé, d'extrait de levure (Andreasen, Stier, 1953, 1954, 1956).

Les taux de croissance observés, μ = 0,65-0,45, sont relativement élevés et se conservent pendant 7 à 8 générations (HEYMAN-BLANCHET, CHAIX, 1959). Le taux de croissance μ représente le nombre de divisions cellulaires pendant une heure. C'est l'inverse du temps mis par la cellule pour se diviser.

De plus EPHRUSSI et SLONIMSKI (1950) ont mis en évidence, au contact de l'oxygène, le caractère adaptatif de la formation du système respiratoire d'une levure de boulangerie, multipliée en anaérobiose et dépourvue de système respiratoire.

Plus récemment, l'étude des spectres cytochromiques de la levure cultivée en anaérobiose ou en aérobiose a pu être poursuivie ; l'effet inductif de l'oxygène de l'air a été observé avec plus de précision : la levure anaérobie, qui présente un spectre cytochromique incomplet, synthétise à l'air les composantes hématiniques qui manquaient et le spectre devient complet tel qu'il est classiquement décrit (CHAIX, 1961).

Sur la base de ces données, nous avons entrepris d'évaluer la multiplication levurienne au cours des vinifications de ces quatre dernières années, par la technique de macération carbonique ou par la technique traditionnelle beaujolaise, après avoir défini dans quelles conditions de pH, de potentiel rédox et de concentration en oxygène, s'effectuaient ces vinifications.

III. — MÉTHODES ET TECHNIQUES

1° *Méthodes de vinification*

Nous rappelons que la vinification par macération carbonique de la vendange consiste à introduire la vendange intacte dans la cuve remplie au préalable de gaz carbonique. Pour être certain que la vendange soit saturée de gaz carbonique, on fait arriver ce gaz au fond de la cuve jusqu'à dégagement à la partie supérieure pendant quelques minutes. La cuve est ensuite obturée, sans toutefois l'être hermétiquement afin d'éviter tout danger de surpression.

Dans la vinification traditionnelle beaujolaise la vendange est également introduite entière dans la cuve, cette fois-ci en présence d'air avec foulage faible ou sans foulage.

Dans les deux cas, les cuves contenaient 60 hectolitres de vendange et au cours des années citées les vinifications ont été conduites à partir de raisin Gamay noir à jus blanc, en absence totale de sulfitage, de chaptalisation et d'aération pendant la macération.

2° *Déterminations analytiques*

Nous avons procédé à un certain nombre de déterminations analytiques, la plupart classiques en œnologie :

Densité
Température
Sucre (Fehling)
Acidités totale et volatile
Numération des levures à l'hématimètre de Malassez
pH : phmètre, électrode de verre, électrode au calomel
Potentiel d'oxydo-réduction (rédox) (Pt-KCl saturé).

Le potentiel rédox a été mesuré en utilisant une électrode de Pt et une électrode de KCl saturé, le pHmètre est utilisé comme potentiomètre. Le liquide dont le potentiel est à mesurer est introduit dans une pipette spéciale « Heito » comportant ces électrodes ; le prélèvement se fait par le robinet placé à la partie inférieure de la cuve, toutes les précautions étant prises pour que le prélèvement se fasse à l'abri total de l'air ; la pipette était remplie d'argon au préalable. Les chiffres en mV indiqués sont les chiffres *lus directement sur le potentiomètre*, lorsque le liquide a été une heure au contact des électrodes, l'expérience a prouvé que les chiffres alors ne varient plus.

Pour les transformer en chiffres de potentiel rapportés à l'électrode normale à H_2, il faudrait ajouter à chacun d'eux : + 250 mV (E_hKCl saturé à 20°C).

L'électrode utilisée a toujours été la même au cours d'une même campagne, au début de celle-ci on mesurait le potentiel rédox de solutions à potentiel connu :

— Quinhydrone dans tampon acétate : acétate Na 0,1 M, acide acétique 0,1 M, pH 4,6.
— Quinhydrone dans tampon phtalate : phtalate acide K 0,05 M, pH 3,97.
— Quinhydrone dans HCl N/10.

Les valeurs E_h obtenues étaient voisines à 1 p. 100 près des chiffres des auteurs (HEWITT, 1950).

Oxygène dissous

La détermination de l'oxygène dissous dans les moûts a été faite suivant la méthode polarographique de TÖDT (1958). Cette méthode utilise, sans différence de potentiel extérieur, des électrodes de nature déterminée, l'anode plongeant dans un tampon également déterminé. Selon les conseils de TÖDT, en raison du pH du moût, les électrodes choisies étaient la cathode d'amalgame d'or et l'anode de plomb. Cette dernière plongeant dans un tampon acétate « standard », séparée de la liqueur à doser par une plaque en verre poreux. (TÖDT ne donne aucune précision sur ce tampon ; nous avons admis qu'il s'agissait du tampon acétate ci-dessus, pH = 4,6). Le courant électrique qui prend naissance lorsque l'on ferme le circuit extérieur possède une intensité directement proportionnelle à la concentration en oxygène dissous. Cette intensité est mesurée par un microampèremètre.

Afin d'établir une correspondance entre l'intensité du courant et la teneur en oxygène, nous avons procédé ainsi :

Une solution tampon pH : 3,4 (phtalate de K/HCl), introduite dans la fiole de l'appareil de

TABLEAU I

Mesure de l'oxygène dissous selon WINKLER *et selon* TÖDT

	Saturé avec air (20°C)	Saturé avec N_2 (R) (20°C)	Différence	Résultats
Tampon phtalate HCl pH 3,4 — 3,25				
mg O_2/l (WINKLER)	9,83	0,62	9,21	
µA (TÖDT)	87	7	80	1 µA TÖDT $\frac{9,21}{80} = 0,115$ mg O_2/l(Winkler)
Moût Chardonnay blanc pH 3,25				
µA (TÖDT)	52	9	43	43 × 0,115 = 4,94 mg O_2/l saturé avec air
Vin rouge (Rey à Morancé)				
µA (TÖDT)	49	4,9	44,1	44,1 × 0,115 = 5,07 mg O_2/l saturé avec air

TÖDT, plongée dans le bain-marie de l'appareil à 20°C, est saturée alternativement avec de l'azote R et de l'air ; on mesure dans chaque cas l'ampérage correspondant.

L'azote R de la Société Air Liquide avait une teneur en oxygène ⩽ 5 millionièmes. Avec l'argon dont la richesse en oxygène était ⩽ 1 millionième, les ampérages observés ont été sensiblement identiques à ceux observés avec l'azote R.

Sur des parties aliquotes de ce tampon saturé d'azote ou d'air, on mesure la richesse correspondante en oxygène dissous selon la méthode classique de WINKLER (1908) : celle-ci utilise l'action de l'oxygène sur le chlorure manganeux ; le sel manganique formé est titré par iodométrie après oxydation de l'iodure de potassium.

Le tableau 1 résume ces résultats, une variation linéaire de 1 µA (TÖDT) correspond à 0,116 mg d'oxygène/l (WINKLER). Le tampon phtalate accuse une teneur en oxygène (WINKLER), après satu-

TABLEAU 2

Mesure du potentiel rédox et de l'oxygène dissous selon TÖDT *et* WINKLER *après saturations alternées par l'azote et l'air*

	Température		pH	Milieu tel que			Milieu + air 10′			Milieu + N_2(R) 10′			Milieu + air + N_2 (R)			Milieu + air + N_2 (R) + air		
	TÖDT	WINKLER		µA TÖDT	Rédox (mV)	O_2 WINKLER (mg/l)	µA TÖDT	Rédox (mV)	O_2 WINKLER (mg/l)	µA TÖDT	Rédox (mV)	O_2 WINKLER (mg/l)	µA TÖDT	Rédox (mV)	O_2 WINKLER (mg/l)	µA TÖDT	Rédox (mV)	
Tampon phtalate HCl		20	3,4						9,78									
id.	20	22	3,4	90		9,16	86	260	9,88	7,3	202	0,72	6,8	218		88	260	
id.		22	3,25												0,52			
Moût de raisin : Chardonnay blanc	20		3,25	29	230		52	240		8,8	212		9	212				
id.	20		3,25	17,2			52			9,2			10,2			52		
Vin rouge	20			17,7			49			4,9			6,5			48,5		

ration par l'air, comparable à celle indiquée par TÖDT (1958) pour des solutions aqueuses de phosphate monopotassique 1 p. 100.

Des dosages similaires d'oxygène selon TÖDT ont été effectués sur du moût de raisin et du vin (tabl. 1) : la richesse en oxygène du vin saturé d'air est plus faible que celle indiquée par RIBÉREAU-GAYON (1961).

$$\frac{22,4}{32} \times 5,07 = 3,55 \text{ ml au lieu de } 6 \text{ ml.}$$

Poids moléculaire $O_2 = 32$. Volume moléculaire $O_2 = 22,4$.

Comme il n'a pas été possible d'appliquer la méthode WINKLER au moût et au vin rouges, nous avons essayé de vérifier la méthode TÖDT en procédant à des saturations alternées de ces solutions avec l'azote et l'air ; on mesurait chaque fois l'ampérage et le potentiel rédox correspondant.

Les chiffres (tabl. 2) montrent que les phénomènes sont réversibles et que le potentiel rédox E_h varie peu au cours de ces saturations.

	Variation E_h p. 100 —
Moût de raisin.....	$\left(\frac{240 - 212}{240 + 250}\right)100 = \frac{28 \times 100}{490} = 5,7$ p. 100
Tampon phtalate.....	$\left(\frac{260 - 202}{260 + 250}\right)100 = \frac{58 \times 100}{510} = 11,4$ p. 100

Pour procéder à la détermination de la teneur en oxygène des moûts, nous avons effectué trois mesures : l'une directement sur le moût, l'autre sur le moût saturé d'azote, la troisième sur le moût saturé d'air. Les variations ont permis d'apprécier la concentration en oxygène des moûts.

Étude spectrale de la levure

Ces déterminations ont eu pour but de savoir si les levures développées au cours de ces deux types de cuvaison présentaient le spectre cytochromique de la chaîne respiratoire complète. Cette étude a été faite par spectrographie à basse température (méthode de P. CHAIX et J.-Fr. PETIT, 1956).

IV. — RÉSULTATS

Les résultats obtenus au cours des années 1961, 1962, 1963 et 1964, en vinification par macération carbonique (M. C. I et M. C. II), et vinification traditionnelle (V. T. I et V. T. II) sont groupés en 3 tableaux correspondant à 3 stades :

— tableau 3 : avant le pressurage, premier jour de la cuvaison ;

— tableau 4 : avant le pressurage, pendant la macération, jour correspondant au maximum de levures dénombrées ;

— tableau 5 : après le pressurage, jour correspondant au maximum de levures dénombrées.

Les populations maximales apparentes de levure observées au cours de la macération sont généralement plus importantes dans le cas de la vinification par macération carbonique. Cependant après le pressurage la cuvaison traditionnelle semble accuser des chiffres plus élevés. En ce qui concerne l'année 1963, année froide et pluvieuse, la vendange présentait de nombreux grains pourris : pendant la macération on enregistre dans le cas de la macération carbonique une densité cellulaire sensiblement double de celle de la vinification traditionnelle ; après le pressurage la différence subsiste mais reste moins sensible.

Le pH ne semble pas exercer d'influence notable sur la croissance des levures. On remarquera que les valeurs initiales du pH sont sensiblement identiques au cours des années 1962-63-64; en 1961, celui-ci était nettement plus bas. Cependant les acidités totales présentaient des écarts très sensibles, celles-ci exprimées en grammes. SO_4H_2/l, étaient respectivement pour les années 1961, 62, 63, 64 : 5,84 — 6,43 — 8,02 — 4,51. Les différences d'acidité totale s'expliquent par des différences climatiques observées au cours de ces années.

TABLEAU 3

Moût pendant la macération — Premier jour de la cuvaison

		Dé 15°C	Sucre (g/l)	t°C	Potentiel rédox (mV KCl sat.)	pH
1961	M. C. I	1088		19	360	
	M. C. II	1090		22	318	
	V. T. I	1085	196	21	320	2,8
	V. T. II	1082		22,5	335	3
1962	M. C. I	1 090		19	123	3,2
	M. C. II	1 090		18	140	3,3
	V. T. I	1 085,3		17	190	3,2
	V. T. II	1 091		18	151	3,32
1963	M. C. I	1 086,8	186	14,5	230	3,2
	M. C. II	1 081	186	18,5	280	3,3
	V. T. I	1 087	194	15	165	3,1
	V. T. II	1 083	182	16	172	3,1
1964	M. C. I	1 091,8		17	295	3,25
	M. C. II	1 099	233,6	16	320	3,23
	V. T. I	1 092	204	18	311	3,15
	V. T. II	1 092,7	218,4	14,5	315	3,23

Quels que soient les modes de cuvaison, les potentiels redox observés présentent des variations de même ordre. La nature de l'atmosphère gazeuse initiale n'a pas entraîné de différence de réduction du milieu, néanmoins en 1963, année pluvieuse comme il a été dit plus haut, les potentiels les plus bas ont été observés avec la vinification traditionnelle.

La mesure de la concentration de l'oxygène dissous, par la méthode de TÖDT, a donné, au cours de la campagne 1964, les résultats groupés dans le tableau 6 en ce qui concerne la macération carbonique (M. C. I et M. C. II), et dans le tableau 7 pour la vinification traditionnelle (V. T. I et V. T. II). On voit que la fermentation s'est effectuée en absence d'oxygène dissous, quel que soit le type de vinification étudié. Il peut y avoir initialement une quantité minime d'oxygène, mais quoi qu'il en soit au cours de la fermentation, le moût serait moins riche en oxygène que l'azote R utilisé pour éliminer l'oxygène dissous.

La fermentation paraît s'être déroulée en anaérobiose ; cependant immédiatement après le pressurage les ampérages observés permettent de penser à la présence de traces d'oxygène dans le moût.

TABLEAU 4

Moût pendant la macération — Jour correspondant au maximum de levures dénombrées Population levurienne

		Nombre de jours de macération	Levures (10^6/ml maximum)	Dé à 15°C	Sucre (g/l)	t°C	Potentiel rédox (mV KCl sat.)	pH
1961								
M. C.	I	3	56	1 024		25	108	3,05
	II	2	59,4	1 014		27	48	3,2
V. T	I	4	33,4	1 021		25	160	
	II	2	47	1 040		24	112	
1962								
M. C.	I	3	51,8	1 042		20	50	
	II	3	52,4	1 063		18	52	
V. T.	I	3	40	1 066		19	70	3,19
	II	5	54	1 003		24	— 13	3,6
1963								
M. C.	I	5	84,2	1 028	45	20	0	3,2
	II	4	81,6	1 013	21,75	22,5	45	3,22
V. T	I	5	34	1 032,5		20	40	3,22
	II	4	33,4	1 045	91	17,5	— 0,1	3,1
1964								
M. C.	I	9	47	1 001,2		26	110	3,3
	II	11	27,9	1 014,6		19,5	40	3,5
V. T.	I	5	35,2	1 056	123	19,5	85	3,2
	II	6	26,6	1 060,3	134,6	18,25	85	3,3

Enfin les déterminations spectrographiques des levures ont été très perturbées par la présence des pigments anthocyaniques des moûts. Jamais elles n'ont permis, quelle que soit leur origine du point de vue cuvaison, de distinguer le spectre du cytochrome *c* très distinct chez les levures pourvues du système respiratoire.

V. — DISCUSSION

Au cours de la macération, la *population levurienne maximale apparente* s'élève en moyenne à 50×10^6 *cel/ml*, au commencement on dénombre environ $0{,}5 \times 10^6$ *cellules*, ce qui représente environ 7 générations pour l'un ou l'autre de ces modes de vinification.

Toutefois en 1963 avec la macération carbonique, la population levurienne est supérieure au double de celle présente dans la cuvée traditionnelle ; comme il a été

dit plus haut l'année était pluvieuse, la vendange était partiellement pourrie, la phénoloxydase de la moisissure a peut-être créé une réserve de corps oxydés dans le moût, comme paraissent l'indiquer les chiffres du potentiel rédox.

TABLEAU 5

Moût après pressurage — Jour correspondant au maximum de levures dénombrées Population levurienne.

	Nombre de jours après pressurage	Levures (10^6/ml maximum)	Dé à 15°C	Sucre (g/l)	t°C	Potentiel rédox (mV KCl sat.)	pH
1961							
M. C. I	2	52	1 005		—	81	
M. C. II	0	43	1 017		30	123	
V. T. I	1	80,4	1 022		27	190	
V. T. II	—	—	—		—	—	
1962							
M. C. I	0	42	1 008		20	80	3,6
M. C. II	0	46	1 009		21	81,5	3,65
V. T. I	1	160	1 019		25,5	75	3,35
V. T. II	1	123,8	1 005		23	22	—
1963							
M. C. I	1	134	1 000	1,5	23	— 16	3,21
M. C. II	1	103	1 001	1,45	23,5	— 30	3,24
V. T. I	1	108	1 001	2,10	23	— 40	3,3
V. T. II	1	85	1 008	11,80	20,5	11	3,2
1964							3,35
M. C. I	1	82,2	1 002,7	14,3	27,5	155	
M. C. II	2	92,2	1 013,5		22,5	75	3,65
V. T. I	2	85	0,996	1,9	30,75	85	3,3
V. T. II	2	77,2	1 003,5		22,75	70	3,4

Après le pressurage, les maxima numérés sont différents suivant le mode de cuvaison en 1961 et 1962 : les chiffres sont nettement plus élevés dans le cas de la vinification traditionnelle ; les années suivantes, les chiffres sont sensiblement comparables dans les deux cas.

Les mesures de concentration d'oxygène dissous, faites selon TÖDT, ont montré que l'oxygène est absent du moût au cours de sa fermentation, quel que soit le mode de cuvaison, tout au moins avant le pressurage.

Cette croissance anaérobie de la levure permet de se demander si la levure n'a pas trouvé dans le jus d'écoulement au contact de la vendange les facteurs de croissance nécessaires à ce développement.

La pruine du grain de raisin étudié par divers auteurs (SEIFERT, 1938, 1947 ; MARKLEY et *al.*, 1938) pourrait réaliser un apport lipidique répondant aux données établies par ANDREASEN et STIER (1953, 1954, 1956). MARKLEY et ses collaborateurs ont déterminé la composition de la pruine de raisin de *Vitis labrusca* et ont mis

TABLEAU 6

1964 — Macération carbonique
Concentration en oxygène des moûts — Population levurienne

M. C. I	Temps zéro	1 j	2 j	3 j	4 j	5 j	6 j	7 j	8 j	12 j	13 j
Dé à 15°C	1 091,8	1 089,1		1 087,5	1 084,7	1 077,5	1 048,4	1 023	1 007		1 002,2
pH	3,25	3,25		3,30	3,25	3,27	3,25	3,30	3,27		3,35
Potentiel rédox	295	275		170	130	130	130	100	110	Pressurage	155
µA TÖDT	13	5,40	4,20	4	6	15	4,2	14,6	2,8		3,05
µA TÖDT après sat. N_2 (R)	17,4	4,60	4,70	4,2	7,2	18	3,8	16	2,6		1,75
µA TÖDT après sat. air	102	61	55	48	57	72	70	70	52		29,3
Levures 10^6/ml		0,86	1,24	0,38	3	10,7	18,6	20,2	26		82,2

M. C. II	Temps zèro	1 j	2 j	3 j	7 j	9 j	12 j	14 j	15 j	16 j
Dé à 15°C	1 099	1 098,7	1 095,6	1 093,4	1 035,6	1 027,3	1 008,9	1 001,9		1 029,1
pH	3,23	3,27	3,35	3,40	3,5	3,5	3,5			3,40
Potentiel rédox	320	230	180	140	55	60	30		Pressurage	75
µA TÖDT	14	11	8,8	6,8	2	0,6	0,8	1,63		1,6
µA TÖDT après sat. N_2 (R)	13,2	9,4	9,4	7,6	1,8	0,5	0,8	0,8		1
µA TÖDT après sat. air	64	68	66	68	44	33	50	40,2		17
Levures 10^6/ml		0,72	1,04	2,74	18,2	21,4	18	10,1		34,4

TABLEAU 7

1964 — Vinification traditionnelle. Concentration en oxygène des moûts. Population levurienne

V. T. I.	Temps zéro	1 j	2 j	3 j	4 j	5 j	6 j	7 j	8 j Pressurage	9 j
Dé à 15°C	1 092	1 092		1 086,4	1 086,3	1 056,4	1 040,2	1 024,2	1 012,5	1 014,9
pH	3,10	3,20	3,20	3,30	3,28	3,20	3,30	3,30	3,30	3,30
Potentiel rédox		311	176	155	130	85	115	120	70	120
µA TÖDT		7,3	11,98	5	0,8	5,40	3,4	2,4	2	1,6
µA TÖDT après sat. N_2 (R)		7	11,6	5,5	0,9	7,6	3,2	2,0	2	1,2
µA TÖDT après sat. air		96	70	60	32	58	62	65	56	28
Levures 10^6/ml		1,26	1,56	3,6	21,5	35,2	27,6		25	101

V. T. II.	Temps zéro	1 j	2 j	3 j	4 j	5 j	7 j	8 j	12 j	14 j Pressurage	15 j	16 j	17 j
Dé à 15°C	1 092,7	1 092,4	1 091,8	1 090,9	1 087,5	1 077,2	1 046	1 036	1 005,2	0,999	1 032,4	1 017,7	1 003,5
pH	3,23	3,23	3,30	3,30	3,30	3,30	3,35	3,38			3,41	3,39	3,40
Potentiel rédox	315	260	210	170	110	120	85	75	50				70
µA TÖDT	11,5	7,10	9,20	5,40	3,40	2,8	1,5	3,1	3,38	1,95		1,6	
µA TÖDT après sat. N_2 (R)	9,8	9,0	9,9	6	3,80	2,6	1,2	2	3,4	0,42		1,2	
µA TÖDT après sat. air	60	64	72	66	64	52	40	34	51	44		25	
Levures 10^6/ml		0,34	1,44	2,52	5,24	20	14	12,1	3,4	1,40	53	65	77,2

en évidence parmi les acides gras l'acide oléique et parmi les stérols le sitostérol, ce qui placerait les conditions de la croissance anaérobie de la levure de nos essais dans les conditions préconisées par ANDREASEN et STIER.

L'impossibilité de détecter le cytochrome *c* par spectrographie à basse température est en faveur du fait que les levures sont dépourvues de système respiratoire et se sont développées en anaérobiose. On doit remarquer que cette particularité des levures de vin avait déjà été signalée par d'autres auteurs (LACASSAGNE et *al*, 1939).

Enfin une dernière question à examiner est celle de l'assimilation du CO_2 : cette fixation du carbone minéral par les micro-organismes hétérotrophes est maintenant une notion classique (WOOD et STJERNHOLM, 1962).

En ce qui concerne la levure, LIENER et BUCHANAN (1951), ont mis en évidence la fixation du CO_2 au cours de la croissance cellulaire. STOPPANI et *al.* (1958) ont montré l'incorporation du CO_2 dans des produits intracellulaires et extracellulaires provenant du métabolisme anaérobie et aérobie du glucose.

Dans nos essais il est évident qu'une telle assimilation n'a pu être démontrée, mais on sait que dans le cas de la macération carbonique le rendement $\frac{\text{sucre disparu,}}{\text{alcool formé °GL}}$ est généralement plus faible que dans le cas de la vinification traditionnelle, ce qui pourrait s'expliquer par une économie de sucre, consécutive aux synthèses cellulaires mettant en jeu la fixation du CO_2.

Au cours de nos essais en 1962, ce rapport a été 17,4-17,7 avec la macération carbonique et 17,9-17,8 avec la vinification traditionnelle ; en 1963, 18-18,4 dans le premier cas, 19-18,9 dans le deuxième.

VI. — CONCLUSIONS ET RÉSUMÉ

Les observations recueillies pendant les années 1961-62-63-64 sur la croissance levurienne dans une vendange soumise à la vinification par macération carbonique ou à la vinification par la méthode traditionnelle beaujolaise permettent les conclusions générales suivantes :

1° D'une façon générale, les maxima apparents de levure dénombrés au cours des vinifications par macération carbonique apparaissent, pendant la macération, supérieurs à ceux constatés au cours des vinifications traditionnelles ; néanmoins avec ces dernières, la population levurienne paraît, après le pressurage, plus importante.

2° Au cours de ces deux modes de cuvaison on ne peut discerner de différence du point de vue évolution du potentiel rédox et teneur en oxygène dissous. L'absence d'oxygène au cours de la fermentation paraît démontrée et pose le problème de la présence de facteurs de croissance anaérobie dans les moûts.

Les levures prélevées sur chacune des cuvaisons paraissent dépourvues des cytochromes de la « chaîne respiratoire ».

3° Le rapport $\frac{\text{sucre disparu}}{\text{alcool apparu}}$ est légèrement plus petit dans une macération carbonique que dans une vinification traditionnelle.

Reçu pour publication en octobre 1965.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier le Laboratoire d'Œnologie de Mâcon pour l'aide qu'il nous a apportée en assumant une partie du programme des analyses de l'année 1964.

Nous remercions enfin Mme CHAIX, Professeur de Chimie Biologique à la Faculté des Sciences de Paris, qui a bien voulu se charger de l'étude spectrale de la levure.

SUMMARY

STUDY OF ANAEROBIC GROWTH OF YEASTS DURING VINIFICATION UNDER FULL GRAPE MACERATION

Observation collected during the years 1961 to 1964 inclusively, on the yeast growth in a vintage under carbonic maceration or under the beaujolais traditional process, may drive to the following general conclusions.

1° As a rule, the maxima of yeast enumerated during vinification under carbonic maceration, and before pressing, are higher than the ones enumerated during traditional vinifications ; with the latter ones, however, yeast population seems higher after pressing.

2° Under both fermentation processes, no difference may be discerned as far as the evolution of the Redox potential, as well as the O_2 content are concerned. The lack of oxygen during fermentation appears as demonstrated and rises the problem of the presence of anaerobic growth factors in the musts. The test samples of yeasts taken from any fermentation appear as free of cytochromes of the « respiratory chain ».

3° The ratio $\frac{\text{lost sugar}}{\text{alcohol produced}}$ is slightly lower in a carbonic maceration than in a traditional one.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANDREASEN A. A., STIER T. J. B. Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. — 1953 : I. Ergosterol requirement for growth in defined medium. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **41**, 23-36. — 1954 : II. Unsatured fatty acid requirement for growth in a defined medium. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **43**, 271-281. — 1956 : III. An unidentified growth promoting factor ; its relationship to the essential lipid requirements. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **48**, 317-327.

CHAIX P., 1961. *On the cytochromes of anaerobically cultured yeast. Haematin Enzymes*, 225-234. Pergamon Press, Oxf. London, N. Y., Paris.

CHAIX P., PETIT J. Fr., 1956. *Biochem. Biophys. Acta*, **22**, 66.

EPHRUSSI B., SLONIMSKI P. P., 1950. La synthèse adaptative des cytochromes chez la levure de boulangerie. *Biochem. Biophys. Acta*, **6**, 256-267.

HEWITT, 1950. *Oxydation reduction potentials in Bacteriology and Biochemistry*, 33, Edit. S. Livingstone, Edimbourg.

HEYMAN-BLANCHET T., CHAIX P., 1959. Variation du spectre cytochromique de la levure cultivée en anaérobiose en fonction de ses phases de croissance. *Biochem. Biophys. Acta*, **35**, 85-93.

LACASSAGNE A., SCHOEN M., BERAUD P., 1939. Contribution à l'étude des radio-races de levures. II. Caractères physiologiques de quelques radio-races d'une levure de vin. *Ann. Ferment.*, **5**, 128-152.

LIENER I. E., BUCHANAN D. L., 1951. The fixation of carbon dioxide by growing and no growing yeast. *J. biol. Chem.*, **61**, 529-534.

MARKLEY K. S., SANDO C. E., HEINDRICKS S. B., 1938. Petroleum ether soluble, ether soluble constituents of grape pomace. *J. biol. Chem.*, **123**, 641-654.

RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., 1960. *Traité d'Œnologie*, **1**, 455-456. Librairie polytechnique Ch. Béranger, Paris. *Ibid* 327-330.

RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., 1961. *Traité d'Œnologie*, **2**, 185. Librairie polytechnique Ch. Béranger, Paris.

SEIFERT W., 1938. *Die Chemie der Moster und Weiner*, 43. Édit. J. Diener Mainz, cité par RIBÉREAU-GAYON et PEYNAUD. *Traité d'Œnologie*, **1**, 54, Librairie polytechnique Ch. Béranger, Paris.

SEIFERT W., 1947. *Œsterreichische Weinzeitung*, 13 sept., cité dans B. O. I. V., 20 octobre.

STOPPANI A. O. M., CONCHES L., FAVELUKES S. L. S., SACERDOTE F. L., 1958. Assimilation of carbon dioxide by yeasts. *Biochem. J.*, **70**, 438-455

TÖDT, 1958. *Elektrochemische Sauerstoff messungen*. W. de Gruyter and Co. Berlin, XIV à XV. — Ibid XVII

WINKLER, cité par E. ROLANTS, 1908. *Analyse des eaux d'égouts*, Paris, Masson et C^ie^, 70.

WOOD H. G., STJERNHOLM R.L. 1962 : *The Bacteria*, **3**, 41-117. I. C. GUNSALUS et R. Y. STANIER, Academic Press, New York et Londres.

Ann. Technol. agric., 1966, **15** (1), 113-125

CORPS INTERFÉRANT DANS LE DOSAGE DE L'ACIDE ASCORBIQUE PAR LA DINITROPHÉNHYLHYDRAZINE DANS LES JUS DE RAISIN ET LES VINS

Andrée OURNAC

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne (Aude)

SOMMAIRE

Comme suite à la technique de dosage de l'acide ascorbique dans les jus et les vins colorés, par précipitation au moyen de dinitrophényl-hydrazine après défécation mercurique, exposée précédemment (OURNAC, 1965), l'étude détaillée de la composition du précipité mercurique que l'on élimine et du précipité d'hydrazones que l'on utilise pour le dosage a été abordée.

INTRODUCTION

Dans l'étude précédente (OURNAC, 1965), nous avons vu, que dans un milieu biologique aussi complexe que le jus de raisin ou le vin, la dinitrophénylhydrazine utilisée pour le dosage de l'acide ascorbique, provoque la précipitation non seulement de ce corps mais aussi d'un certain nombre d'autres qui peuvent fausser les résultats. Par ailleurs nous avons constaté qu'une défécation mercurique ne détruit pas la vitamine C et permet l'élimination dans les jus et les vins fortement colorés d'un certain nombre de substances interférentes.

On se propose de rechercher :

1° Les corps qui influencent le dosage et que le mercure élimine ;

2° La présence ou l'absence d'autres substances précipitant avec la dinitrophénylhydrazine et n'étant pas éliminées par le mercure.

TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE

On examinera d'abord au double point de vue : précipitation par la dinitrophénylhydrazine et défécation mercurique, un certain nombre de corps pouvant entrer dans la composition des jus et des vins.

Chacun sera solubilisé dans une solution tampon de bitartrate de potassium à pH 3, puis dilué dans l'acide métaphosphorique à 5 p. 100. La défécation sera effectuée sur la solution à pH 3.

On essaiera par la suite de déterminer la composition du précipité d'hydrazone obtenu dans les jus et les vins en utilisant la chromatographie sur papier et sur couche mince.

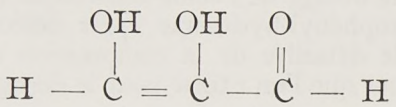
I. Étude des corps susceptibles d'être présents dans les jus et les vins

1) *Corps à fonction diénolique* :

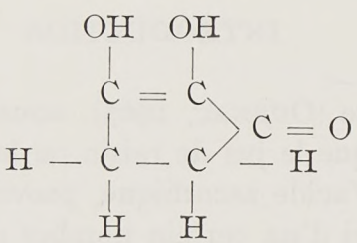
Il existe un groupe de substances, imparfaitement définies, fortement réductrices, possédant un groupement énediol, et qui donnent avec la dinitrophénylhydrazine des hydrazones insolubles au cours du dosage tel que nous le réalisons.

Ces substances qui gênent fortement le dosage de la vitamine C par la méthode envisagée, sont : les réductones et l'acide réductique.

Les réductones proviennent de la dégradation du sucre par chauffage en milieu alcalin, au cours de cette dégradation il y a formation de divers diénols. On donne comme formule de la réductone :



L'acide réductique apparaît au cours du chauffage en milieu acide des pectines. Sa formule est la suivante :



Pour se rendre compte de la présence de ces corps dans le vin, on peut utiliser le test de Penney et Zilva (1945) qui est le suivant :

— L'acide ascorbique, l'acide réductique, la réductone purifiée, donnent après traitement par la dinitrophénylhydrazine à 25°C pendant 15 minutes, respectivement 2,5 p. 100, 92 p. 100, 48 p. 100 de la couleur produite par ces mêmes substances traitées par la dinitrophénylhydrazine pendant 3 heures à 37°.

Nous avons réalisé le test de Penney et Zilva avec les produits suivants :

1. Acide ascorbique pur.
2. Acide réductique (K et K Laboratoires Inc. N. Y.)
3. Réductone purifiée (Bios Laboratories Inc. N. Y.).
4. Réductone fabriquée par nous-mêmes d'après la technique de Von H. Euler et Martius (1933) à partir de glucose pur.

Résultats :

Acide ascorbique :

Jusqu'à une dose de 24 γ dans la prise d'essai, ce qui correspond pour un vin, en tenant compte des dilutions effectuées pour le dosage, à 60 mg, par litre, on ne constate aucune précipitation évaluable après 15 minutes à 25°. Au-dessus de cette dose on obtient à 25° un pourcentage de la dose trouvée à 37° qui augmente avec la quantité d'acide ascorbique mise en jeu. Pour une prise d'essai de 50 γ le pourcentage de précipitation à 25° est de 2,5.

Réductone :

Peu de dosages ont été réalisés avec le produit provenant des BIOS LABORATORIES Inc. N. Y., dont nous disposions d'une très faible quantité.

Le précipité ne se forme que pour des doses assez élevées, il est marron rouge et lourd. La défécation n'en élimine qu'une très faible proportion.

Réductone préparée au laboratoire :

Le précipité d'hydrazone est identique au précédent. Il faut atteindre une certaine concentration pour que la précipitation ait lieu. La défécation mercurique n'en supprime qu'une faible partie.

Acide réductique :

Le précipité d'hydrazone est rouge sang et un peu granuleux. Il se forme très rapidement, presque au fur et à mesure de l'addition de la dinitrophénylhydrazine. La coloration, après action de $H_2 SO_4$ sur ce précipité n'est pas stable, elle diminue continuellement pendant au moins 24 heures. Ce corps n'est éliminé que très faiblement au cours de la défécation mercurique.

Voici ce que l'on peut conclure de ces résultats :

A) Dans nos conditions opératoires, après précipitation 15 minutes à 25°, on obtient le pourcentage suivant de la coloration produite après précipitation de 3 heures à 37° :

1) 0 p. 100 pour l'acide ascorbique à des doses inférieures à 60 mg. par litre et un pourcentage croissant avec la dose mise en jeu.

2) 50 à 60 p. 100 pour la réductone préparée au laboratoire.

3) 20 à 30 p. 100 pour l'acide réductique.

B) Les réductones et l'acide réductique ne sont éliminés que très faiblement par la défécation mercurique.

Pour nous rendre compte de la présence de ces corps dans les vins, nous avons appliqué ce test à un certain nombre d'entre eux avant et après défécation.

Les résultats, consignés dans le tableau n° 1 sont exprimés en mg. par litre de la somme : acide ascorbique + acide déhydroascorbique.

Il ressort de ces résultats que :

Certains vins, non déféqués, donnent par précipitation à 25° une coloration variant de 20 à 40 p. 100 de celle produite à 37°.

Mais après défécation, aucun vin ne précipite après séjour de 15 minutes à 25° en présence de dinitrophénylhydrazine dans nos conditions opératoires.

La dose d'acide ascorbique des vins étant inférieure à 50 mg./l., il est normal qu'il n'y ait aucune précipitation de cet acide à 25°, d'après les résultats déjà obtenus à ce sujet.

TABLEAU I

Teneur « apparente » en acide ascorbique de vins de goutte et de macération

	Dosage effectué					
	Sans défécation			Avec défécation		
	15′ à 25°	3 h à 37°	Test Penney et Zilva	15′ à 25°	3 h à 37°	Test Penney et Zilva
Carignan blanc de goutte	1,9	6,2	30	0	6	0
Carignan blanc de macération	3	10,6	30	0	6	0
Cinsault de goutte..	0	3	0	0	3,3	0
Cinsault de macération	3	11	28	0	4,8	0
Aramon de goutte ..	1,8	4,4	40	0	3,3	0
Aramon de macération.....	6,2	16,2	38	0	3,3	0
Carignan de goutte .	0	10,7	0	0	7	0
Carignan de macération	8,7	36,9	23	0	9	0
Alicante Bouschet de goutte	5,6	21,9	25	0	7	0
Alicante Bouschet de macération	12,5	48	26	0	8	0

La défécation mercurique élimine totalement dans les vins, les corps précipitant à 25°, donc parmi ces corps ne figurent ni la réductone, ni l'acide réductique, qui eux ne sont pas éliminés par cette défécation et précipitent à 25° par la dinitrophénylhydrazine.

On peut alors dire, que les vins, de goutte ou de macération, blancs ou rouges, ne renferment ni réductone, ni acide réductique.

Pour les autres corps que nous allons envisager maintenant la précipitation sera réalisée à 25°, 15′ et à 37° 3 heures.

2) *Corps provenant de l'oxydation de l'acide tartrique*

Genevois et ses collaborateurs, à partir de 1937, puis Baraud à partir de 1950, ont démontré que l'acide tartrique en présence de sels de fer et de cuivre, même aux taux de quelques mg par litre, s'oxyde spontanément avec formation d'acide dioxymaléique qui s'oxyde lui-même en acide dioxytartrique.

Ces corps en C_4 sont très instables, ils donnent lieu à la formation de corps en C_3 : acides tartronique et glyoxylcarbonique, qui ne sont guère plus stables et donnent naissance à des corps en C_2 : acide oxalique, acide glyoxylique, aldéhyde et acide glycolique, glyoxal, qui eux, sont stables en solution.

BARAUD a retrouvé dans les vins des dérivés de l'acide dioxytartrique (acide mésoxalique, acide glyoxylique et glyoxal) et des dérivés de l'acide dihydroxyfumarique (aldéhyde et acide glycolique), mais sans trace dosable de ces deux acides eux-mêmes.

Certains de ces dérivés sont susceptibles de former des hydrazones dans les conditions de dosage de la vitamine C dans les jus et les vins, que nous utilisons. Il fallait étudier leur interférence possible. Nous avons préparé pour cela une solution de bitartrate de potassium à la dose des vins, additionnée de quelques mg de sels de fer et de cuivre. Cette solution produit, dès l'addition de dinitrophénylhydrazine, un trouble orangé rouge, puis un précipité orangé rouge, d'autant plus rapide et abondant que la solution est plus âgée.

Le précipité obtenu à partir d'une solution fraîchement préparée, solubilisé dans l'acide sulfurique à 85 p. 100 n'influence pas le spectro-photomètre, mais à partir d'une solution ancienne il provoque une déviation.

Les vins et les jus produisent, dès l'addition de dinitrophénylhydrazine, pour un volume important de liquide déféqué, un trouble, puis un précipité ressemblant au précédent.

Nous avons constaté que ce précipité n'influence pas, pour les jus et les vins, le dosage de la vitamine C, en effet, des vins présentant ce précipité ne produisent aucune absorption au spectrophotomètre lorsqu'ils ne renferment pas d'acide ascorbique, ce que l'on constate par chromatographie sur couche mince.

Nous avons ensuite traité séparément par la dinitrophénylhydrazine les corps de dégradation de l'acide tartrique mentionnés par BARAUD et que nous avons pu nous procurer. Voici les résultats, pour des doses importantes de produits :

— Acide dioxyfumarique : sans oxydation par le brome on obtient un précipité rouge orangé, lourd ressemblant à celui formé par la solution de bitartrate + Fe + Cu. Après oxydation, très prolongée par le brome, on a un précipité jaune gélatineux..

— Acide dioxytartrique : il produit le même précipité jaune gélatineux.

— Acide glyoxylique : forme rapidement un précipité soyeux jaune citron, qui n'influence pas le spectrophotomètre après dissolution dans $SO_4\ H_2$.

— Acide oxalique : ne précipite pas.

— Acide mésoxalique : forme un précipité jaune vert se dissolvant au lavage à l'eau.

— Acide glycolique : ne précipite pas.

— Aldéhyde glycolique : donne immédiatement un précipité floconneux orange-jaune, qui donne un trouble avec l'acide sulfurique.

— Glyoxal : précipite immédiatement en orange jaune, ce précipité se dissout peu dans l'acide sulfurique.

Il semble que le précipité formé par la solution de bitartrate additionnée de sels ferrique et cuivrique soit constitué par l'hydrazone de l'acide dioxyfumarique.

3) *Catéchine*

La solution de catéchine pure est incolore, elle devient jaune après l'oxydation par le brome. A 25° la catéchine ne produit aucun précipité. A 37°, sans défécation elle donne naissance à un précipité lourd, de couleur vert brun foncé. Elle est éliminée complètement par la défécation. La solution déféquée reste incolore après l'action du brome.

4) *Quercétin et quercitrin*

Ces corps, surtout le quercétin, sont peu solubles, on ajoute de l'alcool pour permettre leur dissolution.

On considère une teneur de 500 mg./litre. Ces deux corps ne précipitent pas à 25°. A 37° ils forment un précipité orangé-marron, mais la défécation les élimine totalement.

5) *Cyanidol* (chlorure de cyanidine)

Le cyanidol précipite à 25° quand il est en solution suffisamment concentrée.
Il précipite à 37°, mais est éliminé par la défécation.
Le cyanidol devient jaune après l'oxydation au brome.

6) *Malvoside* (3-5 diglucoside de malvine)

Il est difficile à déféquer, il faut prolonger le temps de contact avec le sel mercurique. Il est éliminé totalement après une nuit. Après défécation il n'interfère plus.

7) *Delphinidol*

Il précipite à 25° et à 37°, il est éliminé par la défécation. Le précipité est marron foncé.

8) *Pectine*

Nous avons opéré d'abord avec de la pectine de pomme, elle ne donne pas d'hydrazone ni à 25° ni à 37°. De toute façon la défécation l'élimine.

De la pectine précipitée à partir de jus et de vin, forme un précipité qui n'influence pas le dosage.

9) *Glucose et fructose*

Qui ne sont pas touchés par la défécation produisent un faible précipité qui après dissolution ne développe aucune coloration.

10) *Xylose*

Aux doses du vin il ne donne aucun précipité, pour des doses plus élevées il donne lentement un précipité orange-rouge floconneux restant en surface et qui n'influence pas la lecture photométrique.

11) *Arabinose*

A faible dose, il ne précipite pas, à forte dose il produit un précipité floconneux orangé qui reste en surface.

12) *Acide galacturonique*

Aux doses du vin ne produit aucun précipité, à forte dose il produit un précipité orangé floconneux, lourd, qui n'interfère pas.

13) *Acide glycuronique*

Sa présence dans le vin est contestée : DIMOTAKI-KOURAKOU (1962), BLOUIN et PEYNAUD (1963). Aux doses signalées par BLOUIN et PEYNAUD on n'observe aucun précipité, pour des doses supérieures on obtient un précipité orange-rouge floconneux qui n'influence que très peu le spectrophotomètre.

14) *Aldéhyde glycérique*

La solution devient orangée, trouble, puis précipite en rouge orangé lentement. Le précipité ne se dissout pas dans l'acide sulfurique.

15) *Acétoïne* (acétylméthylcarbinol)

Précipite immédiatement à froid en jaune canari pour de fortes doses.

16) *Diacétyle*

Ce corps peut être présent dans les vins ; nous avons regardé son comportement avec la dinitrophénylhydrazine, il forme presque immédiatement un précipité jaune, qui reste jaune aux faibles concentrations et devient orangé pour de fortes doses. Ce précipité ne se dissout pas complètement dans $SO^4 H^2$. A faible dose il ne précipite pas.

17) *Butylène-glycol*

A la dose maximum, où il peut se trouver dans les vins (1 g par litre) et à des doses 10 fois plus fortes, ce corps ne produit aucun précipité.

18) *Acétaldéhyde*

Aux doses moyennes que renferme le vin, 50 mg/l, il ne précipite pas, à des doses plus élevées, il donne rapidement un précipité jaune, devenant orangé par la suite, et se maintenant en surface.

Ce précipité après dissolution dans $H^2 SO^4$ ne manifeste aucune absorption au photocolorimètre.

19) *Acides cétoniques* : pyruvique et α cétoglutarique

Aux doses où ils peuvent figurer dans les vins, BLOUIN et PEYNAUD (1963), ces deux acides ne donnent pas de précipité avec ou sans défécation, nous avons pris comme dose 50 mg. par litre, ce qui donne 20 γ dans la prise d'essai.

Pour des doses beaucoup plus élevées, 800 γ dans la prise, voici ce que l'on constate :

Acide pyruvique : il donne un précipité jaune, grenu, ne se dissolvant pas totalement dans $H^2 SO^4$, il se forme un trouble qui empêche la lecture photométrique.

Acide α cétoglutarique : donne très rapidement en présence de la dinitrophénylhydrazine, un trouble jaune soyeux, qui s'épaissit à la longue. Après l'addition de $H^2 SO^4$ on obtient un liquide limpide qui ne manifeste aucune absorption à 5 300 Å.

Interprétation des résultats

De ces essais il résulte que parmi les substances envisagées pouvant entrer dans la composition des jus et des vins, dans les conditions de dosage utilisées pour l'acide ascorbique :

— Certaines, tout au moins aux doses où elles peuvent se trouver dans les jus ou les vins, ne donnent aucun précipité, ou donnent un précipité n'influençant pas le dosage, ce sont : glucose, fructose, xylose, arabinose, acide pyruvique, acide-α-cétoglutarique, pectines, acétaldéhyde, acétoïne, butylène-glycol, diacétyle, acide glycuronique, acide galacturonique.

— Certaines forment un précipité d'hydrazones qui interfère dans le dosage, mais sont éliminées totalement par la défécation mercurique, ce sont : catéchine, delphinidol, cyanidol, quercétin et quercitrin, malvidol.

— Enfin, certaines, pouvant interférer et ne disparaissant pas après défécation, ne sont pas présentes dans les jus et les vins, ce sont : réductone et acide réductique.

II. Étude du précipité d'hydrazones.

Il reste maintenant à examiner la composition du précipité d'hydrazones utilisé pour le dosage dans les jus et les vins, afin de vérifier la présence de l'hydrazone ascorbique et l'absence d'hydrazones interférantes.

Pour cela nous avons eu recours à deux tests chromatographiques, un sur papier et un sur couche mince.

Les précipités d'hydrazones des différents corps considérés puis des jus et des vins sont centrifugés, lavés à l'eau glacée, solubilisés dans l'acétone et chromatographiés sous cette forme.

1) *Chromatographie sur papier*

C'est une chromatographie descendante sur papier Whatman N° 1.

Les solvants essayés sont :

N° 1	méthanol-éthanol	NH^4OH (0,5 N)	70-10-20
N° 2	méthanol-propanol	NH^4OH (0,5 N)	70-10-20
N° 3	méthanol-butanol	NH^4OH (0,5 N)	70-10-20
N° 4	méthanol-NH^4OH	pure	100—2

Ces divers solvants donnent sensiblement les mêmes résultats, nous utilisons de préférence le N° 2. La durée de cette chromatographie est de 4 h. environ.

Après séchage de la feuille on révèle le chromatogramme avec une dilution N de potasse alcoolique.

Ce test a d'abord été appliqué séparément à toutes les substances dont on vient d'étudier la précipitation. Dans ces conditions, les corps étudiés produisent, non des taches nettes, mais plutôt des traînées de longueurs différentes.

Ces traînées changent de couleur au cours des trois étapes de la chromatographie :

— Écoulement du solvant ;

— Séchage de la feuille à l'air ;

— Vaporisation de la potasse alcoolique.

Voici ce que l'on observe :

Acide ascorbique.

Il forme de suite deux taches contiguës : une verte supérieure et une jaune inférieure. La tache jaune descend plus rapidement, elle suit le front du solvant. La tache verte reste près de la ligne de départ tout en se détachant nettement.

Après séchage : la tache verte devient jaune, la tache jaune devient rouge-rosé, leurs Rf sont respectivement 0,20 et 0,57.

Après vaporisation de potasse : elles deviennent toutes les deux jaune-marron.

L'acide dicétogulonique se comporte de façon identique.

Réductone.

Elle commence à descendre violette. Puis la tache violette s'éloigne et près de la ligne de départ reste une tache marron. Après séchage on observe une traînée jaune près du départ et une traînée violet gris plus bas.

La tache violette fluoresce en rose si on l'expose aux rayons ultra-violets. Après la potasse, la traînée jaune devient bleue-gris tandis que la traînée violette reste violette.

Acide réductique.

Ne s'éloigne que très peu du départ sans se détacher, il est vert pendant la descente du solvant, orangé après séchage et devient vert turquoise après la pulvérisation.

Glucose et Lévulose.

Ils forment une traînée courte jaune foncé ne se détachant pas de la tache de départ, jaune après séchage et violette après la potasse.

Acide dioxytartrique.

Il donne une traînée à partir de la ligne de départ, puis deux taches nettes, contiguës, descendant rapidement. Celle qui est du côté de la ligne de départ est jaune orangé, l'autre jaune vif. Après vaporisation de potasse la traînée devient bleu clair, la tache orangée bleu violet et la deuxième tache marron gris.

Le diacétyle.

Il suit le front du solvant en formant une tache verte devenant rouge framboise par traitement à la potasse.

Acides cétoniques.

Pyruvique et α-cétoglutarique. Ces deux acides se comportent de façon identique jusqu'au traitement à la potasse. Ils donnent deux taches jaunes très distinctes et très nettes, de même Rf, près du front du solvant. Le traitement à la potasse les différencie : l'acide pyruvique devient marron, tandis que l'acide α cétoglutarique reste jaune.

Interprétation des résultats.

Cette chromatographie ne permet pas une séparation absolue des hydrazones de tous les corps étudiés, mais étant donné le comportement différent de chacune au cours des étapes de l'opération, elle permet de les distinguer dans un mélange, ou tout au moins d'avoir des indications sur leur présence ou leur absence. Ce test chromatographique appliqué au précipité d'hydrazone servant au dosage de l'acide ascorbique dans les jus nous révèle :

— la tache rouge très caractéristique de l'acide ascorbique ;

— la tache du glucose et fructose.

Dans le cas des vins on observe : une légère tache jaune, on n'aperçoit pas la tache de l'acide ascorbique, les vins étant trop pauvres en ce corps ou la méthode n'étant pas assez sensible.

De plus, ce test confirme bien l'absence, dans les jus et les vins de réductone et d'acide réductique.

2) *Chromatographie sur couche mince*

A la suite de la proposition faite à l'O. I. V. par les Laboratoires Hoffmann-Laroche (1962) d'une technique de dosage de l'acide ascorbique, et des modifications apportées par Baraud, Genevois et Hebre (1964) en vue de son application aux vins qui ont permis l'élaboration de la méthode officielle (1965), nous avons examiné la composition du précipité à l'aide de la chromatographie sur couche mince telle que ces auteurs la pratiquent.

Les plaques sont recouvertes de gel de silice selon la technique Stahl.

La phase mobile utilisée a la composition suivante : éther éthylique : 75 ml + acétate d'éthyle : 25 ml + acide acétique : 4 ml. Les chromatogrammes sur plaques des hydrazones solubilisées dans l'acétone sont plus nets, plus caractéristiques, plus sélectifs que ceux sur papier. On obtient généralement des taches distinctes et non des traînées, les quantités de produit à utiliser peuvent être plus faibles. A l'inverse du papier où les taches et traînées sont de couleurs très variables, ici, à part l'acide ascorbique qui produit toujours une tache rouge, les taches des autres corps varient entre deux teintes le jaune et l'orangé.

En tête du chromatogramme se trouvent les réactifs. Les corps étudiés susceptibles de se trouver dans les vins et les jus se comportent de la façon suivante :

— acide ascorbique : tache rouge, Rf : 0,72 ;

— glucose et fructose : deux taches oranges de tailles différentes, une de Rf 0,79 une plus petite de Rf : 0,86 ;

— xylose : deux taches orange, une grosse, Rf : 0,90 ,une plus petite de Rf : 0,86 ;

— acide galacturonique : une tache orange, Rf : 0,86 ;

— acide glycuronique : une tache orange, Rf : 0,86 ;

— acétaldéhyde : une tache jaune, Rf : 0,96, devient marron-gris après la potasse ;

— formol : une tache jaune comme l'acétaldéhyde, Rf 0,96, mais elle devient vert foncé avec la potasse ;

— acide pyruvique : deux taches jaunes : Rf : 0,65 et Rf : 0,48 ;

— acide α-cétoglutarique : une tache jaune, Rf : 0,20 ;

— glyoxal : deux taches, une tache jaune, Rf : 0,97 et une tache orangée Rf : 0,94. La tache jaune devient rouge avec la potasse alcoolique ;

— acide réductique : tache rouge grenat, Rf 0,90, devenant verte avec la potasse ;

— réductone : tache marron rougeatre de Rf 0,76.

— aldéhyde glycérique : deux taches, une tache jaune, Rf : 0,40 ; et une tache orange, Rf : 0,94 ;

— acide glyoxylique : une tache jaune, Rf : 0,45 ;

— aldéhyde glycolique : une tache orange, Rf : 0,92 et une tache jaune, Rf : 0,74 ;

— l'acide dioxyfumarique donne deux taches triangulaires oranges, de Rf 0,29 et 0,19 ;

— l'acide dioxytartrique produit une tache orange ne se séparant pas de la tache de départ ;

— la solution de bitartrate de potassium + Fer + Cuivre, donne les deux taches triangulaires caractéristiques de l'acide dioxyfumarique et parfois la tache jaune de l'acide glyoxylique, un long séjour au contact de brome n'oxyde pas l'acide dioxyfumarique.

Chromatoplaques des précipités d'hydrazones obtenus à partir de jus et de vins déféqués.

Contrairement à ce que l'on observe sur papier, les vins qui renferment d'après le dosage photométrique des doses faibles de vitamine C, quelques mg par litre, donnent la tache rouge de l'acide ascorbique, cette technique est donc beaucoup plus sensible.

On observe ensuite, selon les cas, en plus de la tache de la vitamine C :

Pour les jus. — Les taches jaunes des acides cétoniques, les taches oranges du glucose et du fructose, les taches de l'acide dioxyfumarique, et une tache orange de Rf : 0,76.

Pour les vins. — Les taches jaunes des acides cétoniques et de l'aldéhyde et la même tache orange que précédemment de Rf : 0,76.

On n'observe jamais pour les vins les taches des acides dioxyfumarique et dioxytartrique, les vins ne semblent pas renfermer ces corps, ce qui a été déjà constaté par Baraud (1953). La tache orange produite par les jus et les vins ne correspond à aucun des corps essayés, mais de toute façon, le corps qu'elle représente n'interfère pas dans le dosage. En effet, un vin complètement dépourvu de vitamine C d'après le dosage, ne présentant pas la tache rouge de l'acide ascorbique sur chromatoplaque, produit cette tache orange.

D'après ce double examen chromatographique, sur papier et sur couche mince, il semble prouvé que le précipité dont on évalue l'absorption lumineuse en vue de la détermination de l'acide ascorbique, ne renferme pas de corps interférants.

CONCLUSION

Une étude sur la précipitation de dinitrophénylhydrazones dans les jus et les vins, en vue du dosage de l'acide ascorbique, nous permet d'énoncer les constatations suivantes :

— La défécation mercurique pratiquée sur un jus de raisin ou un vin, permet l'élimination des constituants pouvant donner une dinitrophénylhydrazone interférant dans le dosage de l'acide ascorbique, à savoir : catéchine, quercétin, delphinidol, cyanidol, malvidol.

— D'après la chromatographie sur papier et sur couche mince, le précipité d'hydrazones obtenu à partir d'un jus ou d'un vin déféqués, ne semble pas renfermer d'hydrazones faussant le dosage de la vitamine C par voie photométrique.

Reçu pour publication en juin 1965.

SUMMARY

SUBSTANCES INTERFERING WITH THE DINITROPHENYLHYDRAZINE METHOD OF DETERMINING THE ASCORBIC ACID CONTENT OF WINES AND GRAPE JUICE

In an investigation of an already known method for the quantitative determination of ascorbic acid, the author considers in the first part the substances which can exist in wines and grape juice which are liable to precipitate with dinitrophenylhydrazine. Their behaviour during mercuric clarification and during subsequent precipitation by dinitrophenylhydrazine was studied.

Some were eliminated during clarification, others at least at the level at which they occur in the juice and wine, gave no precipitate or gave one which did not influence the determination.

In the second part the author examines the composition of the precipitated hydrazones used in the determination by paper and by thin-layer chromatography.

It was concluded that the precipitate did not seem to include any substances which could give misleading results.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BARAUD J., 1951. Une nouvelle méthode de dosage de l'acide ascorbique. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **18**, 837.

1953. Dosages simultanés de l'acide ascorbique, de l'acide dihydroxymaléique et de la réductone. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **20**, 521.

1953. La réaction de la tartrazine appliquée à l'étude des vins. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **20**, 525.

BARAUD J., GENEVOIS L., HEBRE C., 1964. Dosage de l'acide ascorbique des vins par la 2-4 dinitrophénylhydrazine. *Bull. O. I. V.*, **399**, 484.

BLOUIN J., PEYNAUD E., 1963. Présence constante des acides glucuronique et galacturonique dans les moûts de raisins et dans les vins. *C. R. Acad. Sci.*, **256**, 4774.

BLOUIN J., PEYNAUD E., 1963. Présence constante des acides pyruvique et α cétoglutarique dans les moûts de raisins et dans les vins. *C. R. Acad. Sci.*, **256**, 4521.

DIMOTAKI-KOURAKOU V., 1964. Absence d'acide glycuronique dans les vins. *Ann. Technol. agric.*, **13**, 301.

GENEVOIS, 1937, RIBEREAU-GAYON J., PEYNAUD E., 1961. *Traité d'Œnologie*, **2**, 294. Librairie Polytechnique Ch. Béranger, Paris et Liège.

GENEVOIS L., 1964. Analyse par formation et séparation de dérivés polynitrés. *Chim. Anal.*, **46**, 539-549.

GENEVOIS L., HEBRE C., 1964. Dosage de l'acide ascorbique des vins par la 2-4 dinitrophénylhydrazine. *Méthodes d'Analyses de l'O. I. V., Feuillet vert* n° 148.

HEBRE C., 1963. *Dosage d'acide ascorbique dans les vins.* Thèse d'Ingénieur-Docteur de l'Université de Bordeaux.

HOFFMANN LAROCHE et Cie, 1962. Dosage de l'acide ascorbique. *Méthodes d'Analyses de l'O. I. V., Feuillet vert* n° 118.

OURNAC A., 1965. Étude du dosage de l'acide ascorbique dans les vins et dans les jus fortement colorés. *Ann. Technol. agric.*, **14**, 341-347.

PENNEY J. R., ZILVA S. S., 1945. Interfering substances in the ROE and KUETHER method for the determination of ascorbic acid. *Biochem J.*, **39**, 392-397.

Recueil des Méthodes Internationales d'Analyse des Vins Convention Intern. pour l'Unification des méthodes d'analyse et d'appréciation des vins *O. I. V.*, 1965, Annexe A, Acide Ascorbique p. 28.

VON EULER et MARTIUS C., 1933. Über ein hochreducierendes Zucker derivat (Redukton) *Svensk Kem Tid*, **45**, 73-76.

II. — PROCÉDÉ PROPOSÉ

A. — Principe du procédé

Les acides pyruvique et α-cétoglutarique sont isolés sous forme de 2,4-dinitrophénylhydrazones qui, après extraction au moyen d'oxyde d'éthyle, purification et dissolution dans la solution binormale d'hydroxyde d'ammonium, sont séparées à l'aide de la chromatographie sur couche mince de cellulose à double développement. L'élution des dinitrophénylhydrazones par la solution normale d'hydroxyde de sodium est accompagnée de la production d'une coloration rouge foncée, ce qui permet le dosage électrophotométrique.

B. — Exposé du mode opératoire

Le mode opératoire comprend trois opérations principales : l'isolement des acides cétoniques sous forme de dinitrophénylhydrazones, la séparation chromatographique de ces dernières et le dosage électrophotométrique.

a) *Isolement des acides cétoniques*

1° *Solutions nécessaires.*

— Solution de 2,4-dinitrophénylhydrazine pour analyses à 0,4 p. 100 dans l'acide chlorhydrique 2 N. Le réactif doit être conservé à + 2°C et utilisé pendant 8 jours.
— Oxyde d'éthyle pour analyse.
— Solution d'hydroxyde d'ammonium 2 N, pour analyse.
— Solution normale d'hydroxyde de sodium, pour analyse.

2° *Protocole opératoire.*

Le volume de 10 ml de vin ou de jus de raisin (ou plus, si la teneur en chaque acide est inférieure à 30 mg par litre, mais sans dépasser 30 ml en raison des difficultés au cours des manipulations de l'extraction) est mis dans une petite ampoule à décantation (75-100 ml de capacité) et est additionné de 1 ml de solution de 2,4-dinitrophénylhydrazine. Si la teneur en cétoacides dépasse 75 mg par litre, le volume du réactif doit être porté à 1,5-2 ml. D'ailleurs le manque d'excès du réactif est facile à constater car l'éther de lavage devient rapidement incolore. Dans ce dernier cas, il faut recommencer le dosage. Après l'addition du réactif, on agite et on attend 45 mn. Les dinitrophénylhydrazones formées sont extraites à l'aide d'oxyde d'éthyle à plusieurs reprises, en moyenne de 5 à 10 fois, avec 5 ml chaque fois. La formation d'émulsions peut être combattue par addition de quelques gouttes de détergent liquide (Teepol concentré). L'extraction s'effectue jusqu'à l'obtention d'une couche éthérée incolore.

Les fractions éthérées réunies sont évaporées, soit dans l'évaporateur rotatif sous vide (pression de 30-60 mm de mercure), soit dans l'étuve à vide (pression 10 mm de mercure) à une température ne dépassant pas 30°C. Le résidu obtenu est dissous immédiatement dans 4 ml de solution binormale d'hydroxyde d'ammonium (d'ailleurs, c'est un volume minimal en dessous duquel la dissolution du résidu n'est pas complète). Si le résidu n'est pas utilisé immédiatement, il doit être conservé sous vide. La solution obtenue est transvasée dans un petit décanteur et lavée avec de l'oxyde d'éthyle pour éliminer l'excès de 2,4-dinitrophénylhydrazine et les hydrazones neutres. Le lavage est arrêté au moment de la disparition de coloration brune de la couche d'oxyde d'éthyle additionnée de solution normale d'hydroxyde de sodium. La solution ammoniacale doit être utilisée le plus rapidement possible.

b) *Chromatographie multiple en couche mince de cellulose*

1° *L'appareillage et technique chromatographique utilisés.*

Pour effectuer la chromatographie en couche mince, nous avons fait appel à l'appareillage le plus simple, à savoir « (Serva TLC-System » (Serva Entwicklungslabor, Heidelberg, Allemagne) fourni en France par la Société Jarre-Jacquin (Paris).

La technique chromatographique est unidimensionnelle ascendante multiple à deux développements successifs.

2° *Préparation des couches de cellulose sur les plaques de verre.*

Les plaques de verre (longueur — 20 cm, largeur — 10 cm, épaisseur — 6 mm) doivent être complètement dégraissées, car la moindre trace de substances grasses empêche l'étalement de la cellulose. A cet effet, il est indispensable de les laver avec du mélange sulfochromique, par immersion, ensuite de les rincer à l'eau courante, de les frotter avec une poudre à récurer, de les rincer à nouveau à l'eau courante et à l'eau distillée et enfin de les sécher avec du papier-filtre.

La préparation d'une suspension de cellulose à 1 g de Serva-cellulose TLC (sans gypse) dans 7 ml d'eau distillée, s'effectue au moyen d'un broyeur électrique du type, par exemple, Turmix Super Mixer n° 4 (Ste Franco-Helvetica). On verse la suspension obtenue au bout de 2 mn d'agitation sur les plaques et on l'étale à l'aide de l'étaleur. Une fois le revêtement de la plaque terminé, on laisse sécher pendant 12 h à la température du laboratoire.

3° *Obtention des chromatogrammes.*

On trace sur la couche cellulosique à l'aide d'un crayon une ligne de départ située à 3 cm du bord intérieur de la plaque, également une autre ligne à 2 cm du bord supérieur pour marquer le front d'arrêt du solvant. Finalement on dispose d'une longueur de développement de 15 cm. Pour faciliter la pose des bandes de départ sur la couche cellulosique, on utilise l'appareil dérivant des « orgues chromatographiques » (Deibner, Bourzeix, 1960, 1963) et déjà décrite (Deibner, Bourzeix, Cabibel-Hugues, 1964).

L'échantillon est déposé à l'aide d'une pipette de 10 µl (Serva TLC) sous forme de traits de 2 cm séparés les uns des autres par l'intervalle de 2,5 cm. Il est essentiel de ne pas sécher par jets d'air les bandes entre chaque affusion afin d'éviter le dessèchement de la couche cellulosique. Les volumes à chromatographier sont de 50 à 100 µl à choisir suivant l'intensité de coloration du liquide. Pour le premier volume de 10 µl la vidange de la micropipette s'effectue automatiquement, elle devient possible pour les autres affusions à condition de créer une légère surpression. Les taches de départ de forme elliptique peuvent avoir un grand diamètre de 4,5 cm.

4° *Solvants chromatographiques.*

Pour la chromatographie multiple, deux solvants sont employés : le premier solvant est un mélange ternaire, butanol normal : éthanol : eau (40 : 10 : 50 v/v) qui doit être préparé tous les jours à la température de 20°C. Seule la phase organique est utilisée. Le deuxième solvant est un mélange binaire : butanol normal : hydroxyde d'ammonium dté 0,9 (7:1 v/v), qui une fois préparé, peut être utilisé pendant une semaine.

5° *Développement.*

Le développement des chromatoplaques s'effectue à 20°C ± 1° dans des cuves cylindriques Serva (diamètre intérieur — 14 cm, hauteur — 21,5 cm). La couche du solvant dans la cuve est de 1 cm. La saturation de l'atmosphère du récipient par la vapeur du solvant est obtenue à l'aide de bandes de papier-filtre imbibées préalablement de solvant. On dispose deux plaques dans le premier solvant en protégeant la cuve de l'influence de la lumière. La durée de développement est de trois heures. Les plaques retirées de la cuve sont séchées. Au début de notre expérimentation, le développement s'arrêtait à ce stade. Actuellement, l'opération continue. On plonge les plaques sèches dans le deuxième solvant (*n*-butanol:hydroxyde d'ammonium) pour une durée de deux heures. Les plaques sont retirées lorsque le front du solvant atteint la ligne supérieure, elles sont séchées par de l'air froid à l'aide d'une soufflerie pendant 5 mn.

6° *Élution.*

La surface entourant la tache correspondant à l'acide α-cétoglutarique est grattée à l'aide d'un scalpel et la poudre de cellulose obtenue est mise dans un petit bécher dans lequel on ajoute à l'aide d'une pipette de précision, 5 ml de solution normale d'hydroxyde de sodium, on remue énergiquement avec un agitateur. Le liquide d'un rouge sombre est filtré dans un tube d'Allihn à travers une plaque poreuse (n° 2), recouverte par une rondelle de papier-filtre (Durieux, sans cendres bande rouge, filtration rapide). Le filtrat limpide est reçu dans un tube du Lumetron (diamètre 18 mm), disposé dans une fiole à vide. Le traitement par la solution alcaline, la filtration sous vide doivent durer 5 mn exactement. Au bout de ce délai, on effectue les lectures photoélectriques. On

procède de la même façon pour les deux bandes d'acide pyruvique, mais avec 10 ml de solution d'hydroxyde de sodium.

c) *Dosage électrophotométrique*

1° *Acides de référence.*

Comme substances de référence, nous avons utilisé les acides α-cétoglutarique et pyruvique, qualité purissima de la Ste Fluka (Suisse), conservés à la température de 2°C. Le pyruvate de sodium de même origine et de même qualité (pureté 99,5 p. 100) remplace avantageusement l'acide pyruvique à cause de sa plus grande stabilité.

2° *Étalonnage de l'électrophotocolorimètre à filtre.*

L'appareil utilisé est un colorimètre photoélectrique Lumetron, modèle 401 (Photovolt C°, U.S.A.). On emploie le filtre bleu, avec le maximum d'absorption à 420 nanomètres. L'étalonnage de l'appareil est fait à l'aide d'une gamme de solutions de concentrations croissantes. A cet effet, un mélange de deux solutions à 100 mg de chaque acide par litre de manière à obtenir quatre mélanges dont la teneur totale en cétoacides est de 100 mg par litre et contenant 80, 60, 40, 20 mg d'acide α-cétoglutarique par litre et respectivement 20, 40, 60, 80 mg d'acide pyruvique. On peut également préparer des solutions contenant 20, 40, 60, 80 mg de chaque acide dans un litre en partant d'une solution-mère à 500 mg de chaque acide par litre. Les essais doivent être effectués dans la journée à cause de l'instabilité des acides. La prise d'essai est de 10 ml. On effectue toutes les opérations et on obtient le volume de 4 ml de solution ammoniacale des dinitrophénylhydrazones. Le volume chromatographique est de 0,1 ml. L'étalonnage avec chaque solution doit être répété 7-8 fois afin d'obtenir un résultat moyen sûr. Voici la relation établie à la suite de nombreux essais avec les cétoacides contenus dans les flacons ouverts pour la première fois entre les densités optiques et les quantités d'acide :

	Densité optique	
Quantités en mg	Alphacétoglutarique	Pyruvique
0,005	0,08	0,08
0,010	0,18	0,15
0,015	0,25	0,23
0,020	0,35	0,29

Pour augmenter la précision des mesures il est préférable d'utiliser les densités optiques supérieures à 0,20, si cela est possible.

En principe, les titres des solutions d'acides cétoniques obtenues par dilution des solutions-mères devaient être vérifiées à l'aide des méthodes de dosage appropriées. Nous avons admis que les substances de références utilisées sont pures et que la dilution ne détermine pas de réactions diminuant les concentrations des solutions obtenues en cétoacides.

3° *Mesures et calcul des résultats.*

Pour effectuer la mesure de la densité optique d'une solution inconnue, contenant soit l'acide α-cétoglutarique, soit l'acide pyruvique, on utilise le tube calibré de 18 mm de diamètre. Comme essai à blanc, on utilise la solution normale d'hydroxyde de sodium. Grâce aux courbes établies, la densité optique lue permet de connaître le nombre de milligrammes de chaque acide contenus dans le volume chromatographique utilisé, 0,05 ou 0,1 ml de solution ammoniacale, soit A mg. Pour 4 ml de solution ammoniacale, correspondant à la prise d'essai de 10 ml de vin, cette quantité sera 80 ou 40 fois plus grande. Finalement, les teneurs en cétoacides en mg/l sont calculées respectivement suivant les relations : A × 8 000 ou A × 4 000.

Si la prise d'essai est de 20 ml de vin, ces relations deviennent A × 4 000 et A × 2 000. De toute façon, le volume maximal de prise d'essai de vin ou de jus de raisin est de 30 ml. Si la teneur en acide cétonique est de l'ordre de 5 mg par litre, ce volume est encore insuffisant pour obtenir une bonne précision ; dans ces conditions, le volume chromatographique doit être porté à 0,1 ml.

III. — RÉSULTATS OBTENUS

Les dosages des acides α-cétoglutarique et pyruvique selon la technique à un seul développement avec le solvant ternaire : *n*-butanol : éthanol : eau (40 : 10 : 50)

dans quelques vins ont fourni les résultats consignés dans les tableaux 1 et 2. Cette technique a été employée longtemps avant la mise au point du procédé à deux développements successifs.

TABLEAU 1

Acides pyruvique et α-cétoglutarique

Teneurs en mg par litre. Prise d'essai 10 ml, volume chromatographique 0,05 ml

Nature, année	Date d'analyse	Pyruvique	α-cétoglutarique
Aramon, 1963, jus pasteurisé, sans SO_2	21-1-64	3,2	6,4
Aramon, 1963, vin sans SO_2	23-1-64	4,0	24,4
Vin rouge Corbières 1963	23-1-64	123,2	0
Vin rouge Corbières 1963	24-1-64	44,8	20,8
Vin rouge Corbières 1963	24-1-64	92,8	25,6
Blanquette de Limoux, demi-sec	juin -64	25,6	19,2
Vin rouge Corbière 1963	17-1-64	142,4	51,6
en vidange	20-1-64	116,8	25,6
bouteille pleine	27-5-64	116,8	38,4
Vin blanc Corbières 1963	15-1-64	64,0	80,0
en vidange	17-1-64	28,8	19,2
en vidange	20-1-64	11,6	19,2
bouteille pleine	27-5-64	14,4	3,2
Vin blanc Corbières 1963	15-1-64	46,4	70,4
en vidange	17-1-64	33,6	13,8
bouteille pleine	27-5-64	32,0	21,2

D'ailleurs, les dosages des cétoacides dans les vins doux naturels (DEIBNER, CABIBEL-HUGUES, 1965 *a*) ont été effectués suivant le mode opératoire utilisant un seul solvant chromatographique

TALBEAU 2

Vins rouges

Pech-Rouge (Aude)

Teneurs en mg par litre. Date d'analyse : juin 1964. Prise d'éssai : 10 ml, volume chromatographique : 0,05 ml

Année, type de vinification	Pyruvique	α-cétoglutarique
1963, Vin rosé	61,6	80
1963, Vendange égrappée	45,6	81,6
1963, Macération ordinaire	29,6	38,4
1962, Vendange égrappée	26,4	49,6
1962, Macération ordinaire	26,4	72,0
1962, Mélange (vendange égrappée, macér. ordinaire et carbonique)	19,2	46,4

Parmi les vins du tableau 1, les vins de Corbières jeunes, rouges et blancs (nº 6, 7, 8), sont caractérisés par les diminutions progressives des acides cétoniques en fonction du temps, surtout pour les bouteilles en vidange.

En ce qui concerne les vins rouges obtenus par les différents procédés de vinification au domaine expérimental de Pech-Rouge (Aude), les vins de macération de l'année 1963 ont été moins riches en cétoacides.

IV. — VALEUR ANALYTIQUE DU PROCÉDÉ DU DOSAGE A DEUX DÉVELOPPEMENTS CHROMATOGRAPHIQUES

L'utilisation de la chromatographie ascendante sur couche mince de cellulose, à deux développements, au lieu de la chromatographie sur papier, a permis, non seulement d'améliorer la séparation et l'élution des dinitrophénylhydrazones des acides -cétoglutarique et pyruvique et ensuite leur dosage électrophotométrique, mais également de diminuer la durée des opérations, qui est assez longue. Même actuellement l'exécution du dosage de deux cétoacides dans quatre vins demande dix heures.

La réussite du dosage des cétoacides est tributaire du mode opératoire employé pour l'élaboration des chromatoplaques qui doit être standardisé. En premier lieu l'état d'humidification de la couche cellulosique, qui ne doit être ni trop humide, ni trop desséchée (Badings, 1964 ; Tomisek, Allan, 1964), joue un rôle décisif, car la séparation des dinitrophénylhydrazones en dépend d'une manière particulière. Le protocole opératoire proposé préconise le séchage des chromatoplaques à l'air libre au laboratoire pendant 15 mn et leur utilisation pendant 24 h, sans les mettre à l'abri de l'air, par temps sec et davantage par temps humide. La préparation de la suspension aqueuse de cellulose est également très importante et demande, dans le cas particulier des cétoacides, le recours obligatoire au broyeur électrique assurant l'obtention régulière des boues uniformes et tenues. Une autre servitude concerne le régime thermique des développements chromatographiques qui doivent s'accomplir à la température de + 20°C, en raison de l'utilisation de mélanges complexes (Shellard, 1964).

La présence des acides ascorbique, déhydroascorbique et dihydroxyfumarique ne pertube pas les résultats du dosage des acides pyruvique et α-cétoglutarique, puisque leurs dinitrophénylhydrazones ne donnent pas la réaction colorée avec la solution normale d'hydroxyde de sodium, malgré l'apparition de taches sur les chromatoplaques aux niveaux de l'acide α-cétoglutarique (due à l'acide dihydroxyfumarique), de l'acide pyruvique (dues aux acides déhydroascorbique, dihydroxyfumarique) et de l'isomère de l'acide pyruvique (dues aux acides ascorbique et dihydroxyfumarique).

Par contre, l'acide phénylpyruvique peut pertuber le dosage de l'acide pyruvique puisque l'isomère de sa dinitrophénylhydrazone, sensiblement plus faible que la tache principale disposée au-dessus de la tache de l'acide pyruvique, se trouve au niveau de l'isomère de ce dernier. Par conséquent, les dinitrophénylhydrazones de l'acide phénylpyruvique donnant une coloration rouge avec la solution alcaline, les résultats du dosage de l'acide pyruvique se trouveraient majorés de 4-5 p. 100 proportionnellement à la quantité de l'isomère, comme nous l'avons indiqué précédemment en confirmant ainsi l'observation de Dancis, Hutzler et Levitz (1963).

Pour être efficace, le procédé décrit exige la présence d'une quantité minimale de chaque acide qui doit être égale ou supérieure à 0,3 mg, ce qui définit les volumes de la prise d'essai et les volumes chromatographiques à savoir :

30-120 mg/l	10 ml.....	0,05 ml
15-30 mg/l	20 ml.....	0,05 ml
Moins de 15 mg/l.....	30 ml.....	0,1 ml

Dans ces conditions, comme l'a montré le calcul statistique, l'erreur relative pour un résultat isolé, comme c'est le cas généralement, est petite et en tout cas ne dépasse pas 15 p. 100, ce qui est une erreur maximale. D'ailleurs les écarts constatés, surtout pour les petites quantités d'acide, s'expliquent par la valeur élevée du coefficient numérique utilisé pour calculer les concentrations exprimées en mg/l, qui est de 8 000 pour une prise d'essai de 10 ml de vin et pour un volume chromatographique de 0,05 ml. D'ailleurs, elle est due à la forte intensité de la coloration produite par les dinitrophénylhydrazones en présence de la solution d'hydroxyde de sodium. D'une façon générale, c'est un défaut propre à toutes les techniques chromatographiques quantitatives sur papier ou sur couche mince dû à un faible volume chromatographique qui détermine l'éventualité d'une erreur bien naturelle, aggravée par l'utilisation d'un coefficient de dilution élevé. Finalement, une erreur de lecture égale à une division de l'échelle du photocolorimètre Lumetron, utilisé par nous, c'est-à-dire à 0,005 de densité optique correspond à 4 mg d'acide cétonique par litre. L'emploi d'un spectrophotomètre plus précis, à monochromateur ou à réseau, permettrait de diminuer l'erreur signalée et d'améliorer partiellement les résultats.

En ce qui concerne l'étalonnage de l'appareil photoélectrique, il est préférable, comme d'ailleurs le recommandent Cavallini et Frontali (1954), d'effectuer toutes les opérations à partir des cétoacides ou de leurs sels, au lieu d'utiliser les 2,4-dinitrophénylhydrazones synthétiques. La pureté des substances de référence doit être sûre et la vérification des titres des solutions-mères utilisées est à exécuter périodiqueent.

Le procédé à double développement chromatographique a été utilisé pour le dosage des acides α-cétoglutarique et pyruvique dans les grains de raisin pendant la maturation, dans le moût de raisin pendant sa fermentation alcoolique ainsi que dans le vin obtenu (Deibner, Cabibel-Hugues, 1964 *b*, *c*).

Reçu pour publication en mai 1965.

SUMMARY

ELECTROPHOTOMETRIC DOSAGE OF THE PYRUVIC AND α-CETOGLUTARIC ACIDS IN GRAPE JUICES AND WINES AFTER SEPARATION OF THEIR DINITROPHENYLHYDRAZONES BY CHROMATOGRAPHY ON THIN CELLULOSE LAYER

This report gives a detailed description of the procedure for the electrophotometric dosage of alpha-cetoglutaric and pyruvic acids in grape juices and wines, which has been worked out after previously carried out investigations.

The method uses the ascending chromatography with uni-dimensional or multiple development on thin cellulose layer, which gives a more precise separation of the dinitrophenylhydrazones from the cetoacids and facilitates their elution and thereby improves the dosage itself.

The advantages offered by the method using a two-dimensional development with the different chromatographie solvents (butanol, ethanol, water, *n*-butanol, ammonium hydroxid) have been put into evidence.

The cetoacid content in the red wines investigated varied from 45 to 142 mg per liter for the pyruvic acid and from 0 to 52 mg for the alpha-cetoglutaric acid, whereas in the white wines their quantities were included between 26-64 and 19-80 respectively.

The ceto-acids are sensitive to the action of the air during the racking ; the alpha-cetoglutaric acid seems to be more stable.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BADINGS H., 1964. Thin layer chromatography under controled conditions. *J. Chromatogr.*, **14**, 265-268.

CAVALLINI D., FRONTALI N., 1954. Quantitative determination of ketoacide by paper partition chromatography. *Biochim. Biophys. Acta*, **13**, n° 3, 439-445.

DANCIS J., HUTZLER J., LEVITZ M., 1963. Thin layer chromatography and spectrophotometry of α-keto-acid hydrazones. *Bioch. Biophys. Acta.*, **78**, 85-90.

DEIBNER L., BOURZEIX M., 1960. Appareil permettant la pose facile et le séchage rapide et simultané de plusieurs taches ou bandes de départ sur les chromatogrammes. *Ann. Technol. agric.*, **9**, 409-424.

DEIBNER L., BOURZEIX M., 1963. Dispositifs pour la préparation rapide des chromatogrammes à développement radial et classique. *Ann. Technol. agric.*, **12**, 141-152.

DEIBNER L., CABIBEL-HUGUES Mireille, 1964 *a*. Évolution de quelques éléments constitutifs dans le grain de raisin au cours de la maturation. II. Acides cétoniques. *Rev. Ferm. Ind. Alim. Bruxelles*, **19**, 144-146.

DEIBNER L., CABIBEL-HUGUES Mireille, 1964 *b*. Évolution de quelques éléments constitutifs dans le moût de raisin rouge au cours de sa fermentation alcoolique ainsi que dans le vin obtenu. II. Acides cétonique. *Rev. Fem. Ind. Alim. Bruxelles*, **19**, 208-209.

DEIBNER L., CABIBEL-HUGUES Mireille, 1965 *a*. Modifications de quelques éléments constitutifs des vins doux naturels au cours de leur traitement thermique prolongé à l'abri de l'air. II. Acides α-cétoniques. *Ind. Alim. agric.*, **82**, 15-16.

DEIBNER L., CABIBEL-HUGUES Mireille, 1965 *b*. Recherches sur la séparation des dinitrophénylhydrazones des acides cétoniques des jus de raisin et des vins au moyen de la chromatographie sur couche mince de cellulose en vue de leur dosage électrophotométrique. *Ann. Technol. agric.*, **14**, 331-340.

DEIBNER L., BOURZEIX M., CABIBEL-HUGUES Mireille, 1964. Séparation des anthocyannes diglucosides par chromatographie sur couche mince et leur dosage spectrophotométrique. *Ann. Technol. agric.* **13**. 359-375.

EGOROV I., BORISSOVA N., 1955. Séparation et dosage des cétoacides dans le vin (en russe). *Doklady Akad. Nauk (C. R. Acad. Sci.) U. R. S. S.*, **104**, 433-435.

EGOROV I., BORISSOVA N., 1956. Dosage cétoacides dans le vin (en russe). *Vinod. i Vinogr.* (Œnologie et Viticulture), U. R. S. S, n° 2, 23-25.

EGOROV I., BORISSOVA N., 1957. Séparation et dosage des cétoacides dans le vin par la méthode de la chromatographie de partage sur papier (en russe). *Biochimiya Vinod.*, n° 5, 253-259, Acad. U. R. S. S, Moscou.

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le manuscrit doit être dactylographié sur papier format 21 × 27, avec un double interligne, au recto seulement. Chaque page sera numérotée et des feuilles séparées seront utilisées pour les références bibliographiques, les tableaux, les légendes des figures et graphiques, etc.

Au début de chaque mémoire, on indiquera : — *le titre du mémoire :* il ne devra pas comporter d'abréviations ni de formules chimiques (sauf pour les isotopes) ; — *le nom des auteurs*, précédé des initiales du prénom pour les hommes, du prénom complet pour les femmes ; — *le nom des techniciens* ayant collaboré à l'étude relatée, précédé de la mention : avec la collaboration technique de... ; — *le nom de l'établissement*, dans lequel ont été effectuées les recherches et son adresse.

Les mémoires seront rédigés, autant que possible, d'après le plan ci-dessous :
a) *sommaire :* résumé suffisamment précis pour que sa lecture renseigne sur la nature du travail et son importance ; b) *introduction*, dans laquelle on indique l'objet des recherches entreprises en relation avec les travaux déjà effectués dans le domaine ; c) *techniques expérimentales et matériel utilisé*, en donnant, sous une forme concise, tous les détails nécessaires que pour le lecteur puisse répéter les expériences ; d) *résultats*, à présenter de la manière la plus brève possible ; e) *discussion et conclusion ;* f) *résumé* destiné à être traduit en anglais comportant une analyse *complète* de l'article ; g) *remerciements* pour les collaborations, les fonds, les dons... ; h) *références bibliographiques.*

Les travaux originaux en anglais doivent présenter la même composition que les mémoires rédigés en français, mais ils comportent obligatoirement un résumé français très *complet* placé en tête de l'article. Les figures, graphiques, tableaux et photographies seront sous-titrés en français.

Pour les autres documents (notes, mises au point, revues, rapports, etc.) l'auteur devra suivre un plan logique et le mettre en évidence par une titration appropriée.

Les références bibliographiques doivent être citées dans le texte de la manière suivante : (Dupont et Duval, 1954). Lorsque la référence comporte plus de trois auteurs, seul le premier auteur sera mentionné, suivi de : et *al.* A la fin de l'article, les références constituant la bibliographie doivent être citées par ordre alphabétique des noms d'auteurs, et par ordre de dates pour un même auteur.

Pour les articles : le (s) nom (s) de (s) auteur (s) suivi (s) des initiales du (des) prénom (s) ; la date de parution de l'article ; le titre de l'article (dans la langue originale pour l'allemand, l'anglais, l'italien, l'espagnol et en français dans tous les autres cas, avec indication entre parenthèses de la langue d'origine, sauf si l'auteur étranger a sous-titré dans l'une des quatre langues mentionnées) ; le titre du périodique en abrégé selon la World List of Scientific Periodicals, ou le Bulletin Signalétique du C. N. R. S. ; le volume ; la première et la dernière page de l'article.

Pour les ouvrages : le nom de l'auteur avec les initiales du prénom ; la date de l'édition ; le titre complet de l'ouvrage dans la langue originale, sans abréviations (pour les langues utilisant des alphabets autres que l'alphabet latin, la traduction du titre sera donnée entre parenthèses, avec mention de la langue d'origine) ; le volume ; la première et la dernière page du paragraphe se rapportant aux résultats discutés, et, si l'on cite l'ouvrage en entier, le nombre de volumes et le nombre total de pages ; le numéro de l'édition s'il y en a plusieurs ; le nom de l'éditeur ; le lieu de l'édition. Si l'ouvrage est collectif, on indiquera en plus le nom de l'auteur du chapitre cité, le nom des rédacteurs principaux, précédé de la mention « in », le titre de l'ouvrage.
La mention de « communications personnelles » ou « données non publiées » etc. doit être faite entre parenthèses. Lorsque l'auteur a relevé une référence dans une revue d' « Abstracts », le mentionner à la fin de la référence, entre parenthèses.

Les tableaux, dessins, graphiques, cartes, photographies, doivent être fournis à part. Les tableaux et figures doivent faire l'objet de deux numérations distinctes, en chiffres arabes l'une et l'autre.
Les auteurs peuvent disposer leurs tableaux soit dans le sens de la largeur de la revue, soit dans le sens de la longueur. Dans le sens de la largeur, le total des signes et des espaces disponibles est de 100. Dans le sens de la longueur, il est de 155. Les tableaux en longueur, c'est-à-dire ceux pouvant disposer de 155 signes, ne seront admis que s'ils comprennent plus de 8 lignes de chiffres, de manière qu'une page entière de la revue ne soit pas occupée par un tableau très long et très étroit.
Les graphiques ne doivent pas faire double emploi avec les tableaux.
Les légendes et les énoncés des graphiques et dessins doivent être dactylographiés sur feuille séparée, et porter les numéros des figures.

Les graphiques, schémas, cartes, dessins d'appareils seront envoyés *à l'état de projets,* leur exécution définitive étant confiée au Bureau de Dessin de l'I. N. R. A. Seules deux réductions à l'impression sont admises : *soit* × 0,5. *soit* × 0,25.
Il est rappelé que le format utile des Annales est : 19 × 12,5 cm ; ces dimensions ne doivent pas être dépassées

Photographies : Il est recommandé de fournir des épreuves bien contrastées sur papier blanc, et de préférence en format 9 × 12. Si les photographies doivent être associées pour constituer des planches, on adoptera les normes suivantes : 2 photos 9 × 12, 4 photos 9 × 5,5, 6 photos 5,5 × 5,5. Dans ce cas, chaque photo devra porter un numéro en chiffres arabes visible après clichage.
Les légendes des photographies doivent être dactylographiées sur feuilles séparées et porter les numéros des figures.

Correction des épreuves : les auteurs recevront deux épreuves à corriger. Les corrections « d'auteur » ne sont autorisées que sur le premier jeu d'épreuves.

Envoi du manuscrit : M. Flanzy, Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne (Aude) France, ou M. Mocquot, Station centrale de Technologie des Produits animaux, Jouy-en-Josas. Seine-et-Oise). Envoyer deux exemplaires.

Le Directeur-Gérant : M. L. CAGNAC

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 5-1966.

Dépôt légal : 2e trimestre. 1966 *N° d'impression : 752.*

ANNALES
DE
TECHNOLOGIE
AGRICOLE

VOLUME 15 1966 NUMÉRO 2

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle - PARIS-7e

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs et de l'Institut national de la Recherche agronomique, à l'exception des sommaires et résumés.

Ann. Technol. agric., 1966, **15** (2) 139-147.

ÉTUDE DE TROIS MÉTHODES DE DOSAGE DES SUCRES RÉDUCTEURS

C. BAYONOVE

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 – Narbonne

SOMMAIRE

Le choix d'une méthode internationale de dosage des sucres réducteurs dans les vins est une des préoccupations de la Sous-Commission pour l'Unification des méthodes d'analyse, de l'Office International du Vin.

Au cours de l'étude et de la comparaison de trois méthodes, prises parmi les méthodes retenues, des précisions et des modifications ont été apportées dans la technique de dosage de Gabriel BERTRAND qui, par la suite, a été retenue comme méthode de référence.

I. — INTRODUCTION

La Sous-Commission pour l'unification des méthodes d'analyse pour l'appréciation des vins, de l'Office International du Vin n'a pas encore pu choisir une technique unique de dosage des sucres réducteurs parmi celles qui lui ont été présentées. Le choix d'une méthode de référence se serait peu à peu circonscrit entre deux pondérales (MUNSON et WALKER, 1906 ; WOBISCH et SCHNEYDER, 1954) et deux volumétriques (M. POTTERAT, 1956 ; Gabriel BERTRAND, 1906).

L'étude de trois de ces méthodes m'a été confiée, le soin d'étudier les autres étant réservé à d'autres expérimentateurs.

II. — MÉTHODES ÉTUDIÉES

Nous avons comparé les méthodes de : MUNSON et WALKER, WOBISCH et SCHNEYDER et Gabriel BERTRAND.

Ces méthodes sont basées sur le principe suivant : réaction d'un excès connu de liqueur cuproalcaline dans des conditions bien déterminées sur la solution sucrée à titrer et mesure de la quantité

d'oxyde cuivreux obtenu. Dans les deux premières, on pèse l'oxyde cuivreux (1), dans la troisième on fait réagir cet oxyde cuivreux sur une solution sulfurique de sulfate ferrique et dose par manganimétrie le sulfate ferreux produit par cette réaction.

Les détails opératoires de chaque technique sont rassemblés dans le tableau suivant pour en permettre la comparaison.

Les solutions	Munson et Walker	Wobisch et Schneyder	Gabriel Bertrand
Cuprique	69,378 g/l. (sulfate de cuivre pur)	69,29 (sulfate de cuivre pur)	40 g/l. (sulfate de cuivre pur)
Alcaline :			
sel de seignette	346 g/l.	346 g/l.	200 g/l.
soude	100 g/l.	103,2 g/l.	150 g/l.
			— Solution ferrique
			— Solution $KMnO_4$ N/10
Les techniques			
Prises :			
solution cuprique ...	25 ml	25 ml	20 ml
solution alcaline	25 ml	25 ml	20 ml
solution à doser	50 ml (1)	50 ml (1)	20 ml
Total	100 ml	100 ml	60 ml
Chauffage.....	dans un becher couvert d'un verre de montre	dans un becher couvert d'un verre de montre	dans un erlenmeyer
Durée de chauffage ...	l'ébullition doit être atteinte en 4′ ± 5″ et celle-ci maintenue 2′	l'ébullition doit être atteinte en 2′ et celle-ci maintenue 2′	l'ébullition doit être maintenue 3′ à partir du début de l'ébullition
Après le chauffage		dilution immédiate avec de l'eau froide	laisser déposer le précipité
Entraînement du précipité	sur creuset filtrant à chaud	sur creuset filtrant (environ 30-40°)	sur filtre d'amiante à chaud
Lavage du précipité ...	à l'eau distillée à 60°	à l'eau chaude	à l'eau bouillie
Traitement du précipité	lavage à l'alcool éthylique puis à l'éther et passage à l'étuve à 100° ± 1° pendant 30′	lavage à l'alcool éthylique puis à l'éther et passage du creuset à l'étuve à 100° pendant 2′	dissolution du précipité dans la liqueur ferrique acide
Dosage	par pesée du précipité après refroidissement à l'exicateur	par pesée du précipité après refroidissement à l'exicateur	le fer ferreux formé et dosé par $KMnO_4$ N/10

(1) En réalité le volume de la solution utilisée dépend de la quantité de sucre mais dans tous les cas on complète le volume à 50 ml.

Réactifs utilisés

Pour les méthodes Wobisch et Schneyder, Munson et Walker :

— Solution cuprique : 69,26 g de sulfate de cuivre pur par litre d'eau distillée.

— Solution tartro-alcaline : 346 g de tartrate de sodium et de potassium, 103 g d'hydroxyde de sodium par litre d'eau distillée.

— Alcool éthylique à 95°.

— Éther distillé.

— Solutions titrées de sucre interverti à partir de saccharose R.P. broyé et desséché dans le vide sulfurique à froid.

(1) La méthode de Munson et Walker comporte aussi dans une variante plus compliquée la dissolution du Cu_2O et la pesée du cuivre obtenu par électrolyse. Mais nous n'avons essayé que le procédé simple.

— Solution I à pH 6,0 : 4,75 g de saccharose sont dissous dans 800 ml d'eau environ auquel on ajoute 20 cm³ d'acide chlorhydrique pur, on agite et laisse quelques minutes au repos. Le récipient contenant le liquide sucré est mis dans un bain d'eau froide au départ mais chauffé progressivement jusqu'à 70°. La solution sucrée est laissée ainsi cinq minutes à cette température, puis laissée refroidir à l'air en dehors du bain-marie. Après refroidissement : cette solution est neutralisée en présence de rouge de méthyle à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium à 30 p. 100 au début, puis normale jusqu'à pH 6,0. On vérifie que ce pH n'est pas dépassé par quelques gouttes de bleu de bromothymol qui doit rester jaune. La solution est portée au litre à 20°C.

— Solution II à pH 0,5 : elle est hydrolysée exactement comme la première, puis après refroidissement complétée au litre sans neutralisation.

Ces solutions doivent contenir 5 g de sucre interverti par litre.

III. — RÉSULTATS

1. *Stabilité des solutions de sucre interverti*

Un certain nombre d'essais par ces trois méthodes nous ont montré que la solution presque neutralisée dont le titre était de 4,98 g par litre au moment de sa préparation s'est abaissé en 13 jours à 4,93 g par conservation à la température du laboratoire (18-20°).

Au contraire, la solution où toute l'acidité chlorhydrique a été maintenue a conservé son titre de 4,98 g par litre sans variation pendant la même période.

Chacun de ces dosages a été fait trois fois, à chaque moment la dispersion des résultats étant de 4,98 ± 0,01 g/l.

2. *Essai des deux méthodes pondérales*

Elles nous ont donné sensiblement les mêmes résultats sur les solutions acide et neutre.

	Saccharose réduit en g/l	
	Sol. acide	Sol. neutre
Méthode Wobisch et Schneyder..	4,95-5,04	4,93-4,98
Méthode Munson et Walker.....	4,96	4,94

Mais la méthode de Munson et Walker est nettement plus longue. De plus, nous avons observé que les creusets filtrants en verre pyrex que nous utilisions pour recueillir l'oxyde cuivreux, diminuaient de poids progressivement par suite de la dissolution du pyrex par la solution cupro-alcaline. Ainsi, en faisant passer à trois reprises différentes, un mélange chaud de 50 ml de solution cuprique, 50 ml de solution alcaline et 100 ml d'eau, le poids du creuset de pyrex baissait de 28 mg. L'expérience effectuée avec deux autres creusets nous a donné des résultats tout à fait semblables. En conséquence, nous avons renoncé à poursuivre l'étude de ces méthodes, qui nous exposent à des erreurs systématiques importantes par défaut.

Nous avons appris ultérieurement par M. COSTA-NETTO, que cette méthode nécessite l'emploi de creusets en porcelaine spéciale dont nous n'avons pu disposer et dont l'emploi n'était pas précisé par ce dernier sur le feuillet vert n° 125 de l'Office International de Vin. MUNSON et WALKER préconisent d'après l'*Association of Official Agricultural Chemists* l'emploi d'un creuset de Gooch garni d'amiante très soigneusement lavée par différents réactifs. L'emploi de tels creusets rend la méthode peu pratique.

3. *Étude de la technique de* Gabriel BERTRAND

a) *Effet de l'oxygène de l'air.*

Dans son mémoire original, Gabriel BERTRAND prescrit de faire bouillir trois minutes exactement le mélange de 20 ml de solution sucrée avec 20 ml de solution cuprique et 20 ml de solution tartro-alcaline. Il indique qu'après ce temps d'ébullition on laisse reposer quelques instants la solution, et on filtre la liqueur sur un filtre d'amiante placé dans un entonnoir cylindrique.

On sait, M. ARNOUX et J. PASTOR (1954) l'ont à nouveau bien précisé, que la relation entre l'oxyde cuivreux et la quantité de sucres réducteurs dépend, d'une manière importante, des conditions de la réaction des sucres sur la liqueur cupro-alcaline, conditions de concentration, de température, de durée. On doit, d'autre part, se demander si avant ou pendant la filtration l'oxyde cupreux formé ne risque pas de s'oxyder sous l'action de l'oxygène atmosphérique. Nous avons toujours fait bouillir notre mélange de solution sous réfrigérant à reflux, pour être certain que le volume reste constant. Une évaporation pendant l'ébullition, augmentant les concentrations, modifie les conditions de la réaction. Cette cause d'erreurs peu importante d'après M. ARNOUX et J. PASTOR (1954) est facile à éviter par l'emploi d'un réfrigérant ascendant.

Pour étudier l'action de l'air, et d'un refroidissement plus ou moins rapide après la réaction, nous avons utilisé des flacons en pyrex à bouchage émeri que nous avons chauffés au bain-marie bouillant pendant 15 mn. Après les réactions, nous avons effectué quatre opérations semblables, mais le premier flacon était refroidi rapidement par immersion dans l'eau froide, flacon bouché à chaud de sorte que le refroidissement s'est fait à l'abri de l'air. Un deuxième flacon a été refroidi identiquement dans l'eau froide mais ouvert. Dans les deux autres essais, le flacon s'est refroidi spontanément à l'air, l'un bouché, l'autre ouvert. Les expériences répétées ont montré que la quantité d'oxyde cuivreux obtenue était identique dans les flacons refroidis rapidement à l'air ou en l'absence d'air, au contraire les flacons refroidis lentement, et bouchés, ont donné une quantité plus forte d'oxyde cuivreux que lorsque les flacons sont refroidis brusquement. La réaction des sucres sur la liqueur cupro-alcaline continue pendant le lent refroidissement. Au contraire, en flacon refroidi lentement en présence d'air, la quantité d'oxyde cuivreux est plus faible qu'en l'absence d'air, et plus faible que dans les essais issus de flacons refroidis brusquement. Bien que la réaction de la solution cupro-alcaline sur les sucres se soit prolongée pendant le refroidissement lent, l'action oxydante de l'air est venue à chaud oxyder une petite quantité d'oxyde cuivreux et cet effet l'a emporté sur le premier. D'autres essais nous ont montré que si après les 3 minutes d'ébullition de la méthode normale, nous refroidissons en agitant

fortement le liquide de manière à favoriser le contact de l'air, nous obtenons des résultats très inférieurs (0,5 à 0,7 ml de permanganate N/10 en moins au titrage) par rapport à ceux obtenus alors que nous refroidissons le liquide en évitant toute agitation que le flacon soit ou non bouché.

Les exemples suivants montrent les effets de l'oxydation par l'air :

Sucres (mg)	25	35	50	60	75	85	100
MnO_4K 0,1 N (ml)*	7,7	10,6	14,9	17,6	21,6	24,15	28
MnO_4K 0,1 N (ml)**	7,3	10,2	14,2	17,1	21	23,5	27,4
Différence	0,4	0,4	0,7	0,5	0,6	0,65	0,6

*Refroidissement sous courant d'eau en flacons ouverts et sans agitation.
**Refroidissement identique mais avec agitation.

Nous pensons donc que la technique de Gabriel BERTRAND doit être précisée pour éviter ces effets secondaires après les trois minutes d'ébullition, effets qui peuvent rendre les résultats du dosage variables avec le temps et les précautions prises lors de la filtration. Après les trois minutes d'ébullition, il nous paraît préférable de refroidir brusquement l'essai dans un bain d'eau froide renouvelée, en évitant toute agitation, ou même mieux en flacons bouchés, l'oxydation du précipité se produit à une vitesse négligeable dès que la suspension est refroidie.

b) *Utilité d'un indicateur de fin de réaction.*

Au cours de nos essais, nous nous sommes rendus compte que le virage final du titrage manganimétrique des sels ferreux pouvait être sensibilisé par l'emploi de réactifs d'oxydo-réduction qui étaient inconnus au début de ce siècle. Les plus employés sont le diphénylamino-sulfonate de baryum et l'orthophénantroline ferreuse. Tous les deux donnent des virages très visibles. Le premier virant de l'incolore au violet au potentiel 0,84 volts à pH 0, tandis que l'orthophénantroline vire au potentiel 0,95 volts dans un milieu au même pH.

Si le premier est très employé pour le dosage chromométrique du fer, le second est plus particulièrement recommandé pour le dosage manganimétrique de ce métal. Le potentiel auquel il faut s'arrêter lorsqu'on dose le fer par une solution oxydante est donné par l'expression : $E = \frac{E_1 + E_2}{2}$; E_1, potentiel d'oxydoréduction normal du Fe^{++} en Fe^{+++} = 0,61 volt ; E2, potentiel normal d'oxydoréduction de la solution oxydante = 1,5 volt. Par conséquent, il faut arriver au potentiel E = 1,05 volt avec une tolérance en plus ou en moins de 0,1 V (CHARLOT, 1955). On voit que dans ce cas l'orthophénantroline est un bon réactif. Effectivement, la coloration en rouge de l'orthophénantroline est complémentaire de la coloration verte du sel ferrique mélangé à du sulfate de cuivre, le virage est très visible et très sensible, et beaucoup plus précis que l'apparition rose due à un excès de permanganate.

c) *Action du saccharose sur la liqueur cupro-alcaline.*

Lorsqu'on examine les tables de MUNSON et WALKER, WOBISCH et SCHNEYDER pour transformer le poids d'oxyde en sucre, on constate que ces auteurs indiquent une correspondance entre l'oxyde cuivreux et le sucre interverti qui varie avec la

présence ou l'absence de saccharose. Le saccharose ayant une action réductrice non négligeable sur la liqueur cupro-alcaline, Gabriel BERTRAND n'avait pas indiqué d'influence de cette nature, nous avons donc cru utile de l'étudier.

Dans la technique de Gabriel BERTRAND une solution à 5 g par litre de saccharose a réduit la liqueur cupro-alcaline autant qu'une solution à 0,14 g de sucre interverti par litre. Nous avons constaté que si nous titrons une solution contenant 5 g/l de saccharose et 5 g/l de sucre interverti, nous trouvons 4,98 g/l de sucre interverti, alors qu'en titrant la liqueur renfermant le sucre interverti seul, nous trouvons 4,96 g/l. Dans cette technique, tout se passe donc comme si le saccharose n'avait à peu près aucune influence sur la liqueur cupro-alcaline. Autrement dit, l'action du sucre interverti et celle du saccharose ne s'ajoutent pas.

Étant donné que dans les vins, même après chaptalisation, il ne reste du saccharose que dans des conditions exceptionnelles, il n'y a pratiquement pas lieu de tenir compte de cet effet dans l'analyse des vins. Sinon dans les jus sucrés renfermant une grande quantité de saccharose, pour lesquels il conviendrait d'établir empiriquement des tables donnant la quantité de sucres réducteurs d'après le volume de permanganate employé, pour diverses concentrations en saccharose de la solution.

4. *Conclusion* : *Méthode* Gabriel Bertrand *modifiée*

Mode opératoire.

Dans un erlenmeyer de 300 ml, mettre 20 ml de liqueur cuprique A, 20 ml de liqueur tartro-alcaline B et 20 ml de liqueur sucrée contenant 10 à 100 mg de sucre réducteur. Porter à ébullition le plus rapidement possible sous réfrigérant et maintenir celle-ci 3 minutes exactement en ralentissant le chauffage. Puis refroidir immédiatement sous courant d'eau en évitant soigneusement d'agiter le flacon si celui-ci ne peut être hermétiquement fermé, jusqu'à complet refroidissement, laisser déposer l'oxyde cuivreux et filtrer la liqueur sur un filtre d'amiante lavée en activant la filtration par l'aspiration d'une trompe à eau. Laver trois fois l'oxyde cuivreux avec 20 ml d'eau bouillie froide. Dissoudre l'oxyde cuivreux avec 30 ml de liqueur ferrique C placés dans l'erlenmeyer puis versés sur le filtre, mettre l'amiante chargée d'oxyde cuivreux en suspension dans cette liqueur ferrique à l'aide d'un agitateur pour permettre la dissolution de tout cet oxyde. Collecter la liqueur ferrique partiellement réduite dans une fiole tubulée en s'aidant d'une aspiration modérée : rincer l'erlenmeyer et le filtre d'amiante avec cinq fois 20 ml d'eau. Ajouter 1 goutte d'orthophénantroline ferreuse.

Titrer le sel ferreux formé par la solution normale décime de permanganate de potassium ; le virage est obtenu lorsque la couleur passe du vert orangé au vert franc.

Il n'est pas évident que la correspondance entre la quantité de sucre à doser, la quantité d'oxyde cuivreux obtenue ou la quantité de $KMnO_4$ employée sera la même suivant cette nouvelle technique que suivant la technique originelle de Gabriel BERTRAND. Il convenait donc, en suivant cette nouvelle technique de refaire expérimentalement les mesures de volume de permanganate correspondant à différentes concentrations de la solution de sucre interverti mise en œuvre. Nous avons donc traité par cette technique les solutions de concentration 10, 15, 25, 35, 50, 60, 75, 85, 100 milligrammes pour une prise de 20 ml. Ces solutions étant obtenues à partir d'une solution de saccharose hydrolysée, diluée suivant les besoins ; l'hydrolyse ayant été effectuée comme suit : 4,75 g de saccharose pur sont dissous dans un ballon d'un demi-litre d'eau acidifiée par 10 ml d'acide chlorhydrique pur, le tout est chauffé au bain-marie jusqu'à 70° et laissé à cette température 5 minutes, puis le ballon est sorti du bain et laissé se refroidir seul à l'air, nous portons ensuite au litre à 20°. Les résultats de nos essais ont été représentés sur un graphique. La courbe obtenue (fig. 1) est si proche de celle fournie par R. VEILLON que l'on ne peut pas penser à une modification des résultats par les quelques modifications de technique que nous avons essayés (R. VEILLON, 1943).

Réactifs utilisés.

— *Solution cuprique A* :

Sulfate de cuivre pur : 40 g.
Acide sulfurique pur : 2 ml.
Eau q.s.p. 1 litre.

— *Solution tartro-alcaline B* :

Tartrate sodico-potassique (sel de Seignette) : 200 g
Soude pure : 150 g.
Eau q.s.p. 1 litre.

— *Solution ferrique C* :

Sulfate ferrique sec pur : 50 g.
Acide sulfurique pur : 200 g.
Eau q. s. p. 1 litre.

Celle-ci doit répondre à l'essai suivant : mettre dans un verre 30 ml de solution C, 100 ml d'eau distillée, 1 goutte d'orthophénantroline ferreuse. Ce mélange doit être jaune-vert et une seule goutte de permanganate 0,1 N doit suffire pour arriver à la coloration vert pur. Ajouter du permanganate 0,1 N à la liqueur C jusqu'à ce que l'essai précité soit satisfait. On ajoute généralement de 1 à 3 ml de $KMnO_4$ N/10 pour 1 litre de solution C.

— *Solution normale décime de permanganate de potassium* :

Permanganate de potassium pur : 3,16 g.
Eau q. s. p. 1 litre.

L'exactitude de cette solution sera vérifiée par titrage à l'oxalate de sodium.

— *Solution d'orthophénantroline ferreuse* :

Sulfate ferreux : 0,695 g.
Eau q. s. p. 100 ml.
Orthophénantroline : 1,485 g.

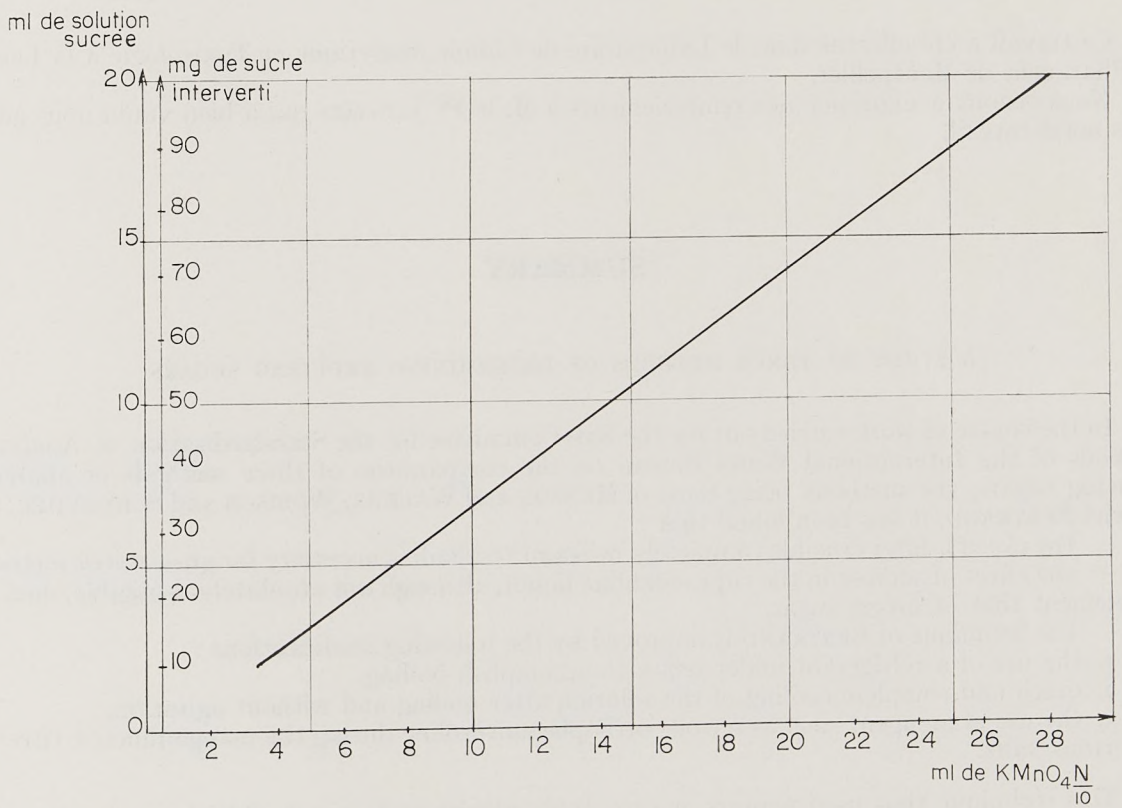


FIG. 1.

IV. — CONCLUSION

L'ensemble de cette étude nous a montré :

— que pour le dosage des sucres réducteurs par des méthodes pondérales, il est nécessaire de bien vérifier que les creusets filtrants soient inattaquables par la liqueur cupro-alcaline.

— le peu d'influence que peut avoir la présence de saccharose surtout dans le cas de vin puisque son action ne s'ajoute pratiquement pas à celle du sucre interverti.

Les modifications apportées à la méthode Gabriel BERTRAND ont été faites sur des points qui sont la source des principales causes de variations. D'autres causes difficiles à saisir peuvent intervenir, et il semble préférable que chaque expérimentateur vérifie lui-même la correspondance entre sucre et permanganate à l'aide d'une solution de sucre interverti exactement titrée, car les écarts imprévisibles de technique entre chaque manipulateur ne sont pas exclus, et un certain entraînement est nécessaire avant de procéder à des dosages que l'on veut précis.

Reçu pour publication en mai 1966.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué dans le Laboratoire de Chimie analytique et Toxicologie à la Faculté de Pharmacie de Montpellier.

Nous tenons à exprimer nos remerciements à M. le Pr JAULMES qui a bien voulu nous guider dans notre travail.

SUMMARY

A STUDY OF THREE METHODS OF DETERMINING REDUCING SUGARS

In the course of work carried out for the Sub-Committee for the Standardization of Analytical Methods of the International Wines Bureau on the comparaison of three methods of analysing reducing sugars, the methods being those of MUNSON and WALKER, WOBISCH and SCHNEYDER, and Gabriel BERTRAND, it has been found that :

— the use of a filter crucible completely resistant to alkali is necessary for gravimetric methods,

— the effect of sucrose in the cupro-alkaline liquor, although not absolutely negligible, does not supplement that of invert sugar,

— the technique of BERTRAND is improved by the following modifications :

1. the use of a refrigerant under reflux to accomplish boiling,
2. quick and complete cooling of the solution after boiling and without agitation,
3. the use of an agent such as ferrous orthophenanthroline during the manganimetric titration of ferrous salts.

This technique thus used permits one to obtain precise and reproducible determinations, but the results must be verified against a standard solution of invert sugar.

This modified Gabriel BERTRAND technique has been accepted as the reference method for determining reducing sugars in wines (*J. Officiel*, 1963).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ARNOUX M, PASTOR J., 1954. Recherche sur le dosage des glucides par la méthode de Gabriel BERTRAND. I. Influence des divers facteurs sur le dosage fixe de glucose. *Bull. Soc. Pharm.*, Marseille, 1954, n° 11, 191-203.

ARNOUX M., PASTOR J., MOREL B., 1958. Recherche sur le dosage des glucides par la méthode de Gabriel BERTRAND. II. Influence de la composition des réactifs sur le dosage du glucose. *Bull. Soc. Pharm.*, Marseille, 1958, t. VII, n° **27**, 231-240.

BERTRAND G., 1906. Le dosage des sucres réducteurs. *Bull. Soc. Chim.*, **192**, 1285-1299.

CHARLOT G., BÉZIER, 1955. Réactions entre les oxydants et les réducteurs, oxydimétrie. *Analyse quantitative minérale*, 3e Édition, Masson et C ie éditeurs, p. 51-115.

JOURNAL OFFICIEL DE LA RÉPUBLIQUE FRANÇAISE, 1963, n° 63-154, 4572-4573.

MUNSON et WALKER, 1906. Extrait de : Methods of analysis of the Association of the Official Agricultural Chemists, 9e édition 1960. — Published, by the Association of Official Agricultural Chemists P.O. Bor 540-Benjamin Franklin Station, Washington. 4, Dc. — Invert. Sugar Chemical Methods, n° 29.038, p. 427.

POTTERAT M., ESCHMANN H., 1956. Application des complexons au dosage des sucres. *Ann. Fals. Fraudes*, **49**, n°575, 464.

VEILLON R., 1943. Tables dérivées des tableaux de G. BERTRAND donnant sans calcul la quantité de sucre, correspondant à chaque dixième de centimètre cube de permanganate décinormal employé. *Ann. Ferment.* p. 115.

WOBISCH F., SCHNEYDER J., 1954. Beiträge zur bestimmung von intvertzucker, ù rohrzucker, fruktose und glucose. *Österreichische Chemiker Zeitung* jg. 55 Heft 3/4.

Ann. Technol. agric., 1966, **15** (2) 149-158.

POLYPHÉNOLOXYDASE DANS LE RAISIN

C. POUX

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne

SOMMAIRE

On décrit un mode de préparation de la polyphénoloxydase du raisin et une mesure de l'activité enzymatique sur l'enzyme isolé.

Des mesures de l'activité enzymatique de jus de raisin de différents cépages méridionaux sont comparées, ainsi que sont étudiées l'influence de la centrifugation, du pressurage, de la couleur du cépage, et l'action des moisissures.

INTRODUCTION

Dans l'évolution suivie par le moût de raisin dès le pressurage, avant fermentation on constate souvent un brunissement consécutif à une oxydation, comme cela est observé dans beaucoup de tissus de fruits coupés ou blessés et exposés à l'air.

Ce brunissement a été dans la plupart des cas relié à une action enzymatique catalysant l'oxydation par l'air de certaines substances phénoliques (mono et diphénols) contenues dans les plantes. Les enzymes responsables ont reçu le nom de polyphénoloxydases.

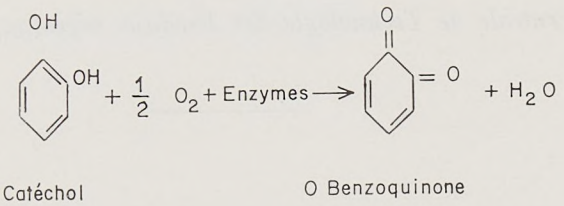
Il nous a paru intéressant de voir comment on pouvait d'abord mettre en évidence ces enzymes dans le raisin, ensuite envisager la possibilité de différencier par un test le pouvoir oxydant de différentes variétés de raisin.

I. — PROPRIÉTÉS GÉNÉRALES DE LA POLYPHÉNOLOXYDASE

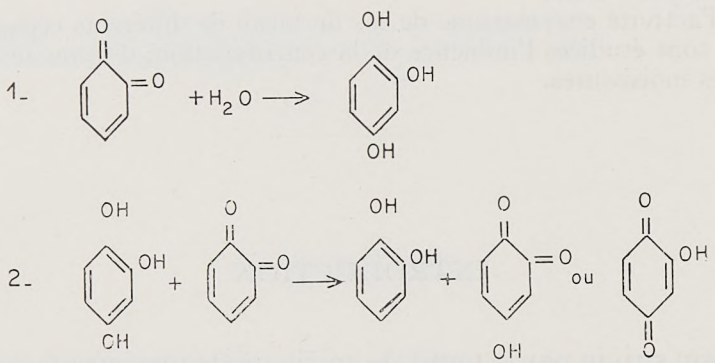
En 1895, G. Bertrand et Bourquelot découvrent la tyrosinase et démontrent que le brunissement de certaines variétés de champignons est dû à l'oxydation enzymatique de l'acide phénol aminé, la tyrosine.

Cet enzyme isolé de champignon ou de la pomme de terre fut reconnu ensuite comme pouvant catalyser à la fois l'oxydation des mono et des diphénols. L'activtié sur les monophénols est appelée activité « crésolasique » et l'activité sur les diphénols activité « catécholasique ». Les deux activités sont le plus souvent associées dans les mêmes préparations enzymatiques et c'est au cours de la purification de l'enzyme que l'activité monophénolasique tend à diminuer aux dépens de l'activité ortho-diphénolasique, c'est la raison pour laquelle on a donné à ces préparations d'enzymes le nom de polyphénoloxydases.

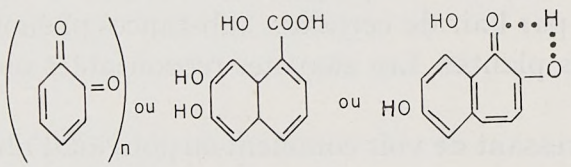
En ce qui concerne l'orthodiphénol (catéchol), l'oxydation peut être schématisée comme suit : (J. B. Braverman, 1963).



Pour ce qui est du brunissement le mécanisme n'est pas à l'heure actuelle élucidé parfaitement et l'on admet généralement la théorie suivante, en trois stades :



3° Formation de composés colorés par polymérisation.



La présence de tyrosinase et de polyphénoloxydase qui ne sont pas des enzymes distincts a été démontrée dans de très nombreux tissus aussi bien animaux que végétaux. La laccase, autre polyphénoloxydase catalysant l'oxydation du laccol, substance phénolique du latex de l'arbre à laque du Japon, se différencie de ces dernières par le fait qu'elle est sans action sur les monophénols.

En ce qui concerne *la nature* de l'enzyme, c'est une protéine de P. M. de l'ordre de 100 000, à contenu en cuivre de 0,25 p. 100 et 4 atomes de cuivre par molécule de protéine (Dawson, 1951).

La mesure de l'activité de l'enzyme se réalise le plus souvent par son action sur les diphénols. Dans ce cas l'enzyme agit comme une « catécholase ». Lorsque l'action porte sur un monophénol, on mesure alors l'activité « crésolasique » qui se différencie de la précédente en ce que la fixation de l'oxygène est caractérisée par une période d'induction, dans laquelle tout se passe comme si la première étape de l'oxydation du monophénol consistait en la conversion du monophénol en orthodiphénol correspondant. Quoi qu'il en soit, il semble bien que l'activité d'une monophénolase et d'une diphénolase sont indépendantes et ces deux activités sont le plus souvent étroitement associées.

II. — LA POLYPHÉNOLOXYDASE DANS LE RAISIN

Les travaux sur la polyphénoloxydase dans le raisin ont fait l'objet d'une mise au point bibliographique récente (Deibner-Rifai, 1963). Les auteurs y exposent aussi leurs résultats sur l'activité de cet enzyme au moyen de la méthode photométrique à la purpurogalline à l'aide d'une technique modifiée et adaptée au jus de raisin qu'ils ont mise au point.

Travaux personnels

Dans ce travail nous relaterons d'abord la préparation et l'isolement de l'enzyme à partir du raisin, ensuite nous exposerons une méthode de mesure de l'activité enzymatique dérivée de la méthode chronométrique de Joslyn et Ponting (1948), décrite pour les tissus de pomme et qui mesure la vitesse de coloration des produits formés par l'oxydation du catéchol.

Techniques

A — *Préparation de l'enzyme*

La technique à laquelle nous nous sommes arrêtés après différents essais de techniques décrites dans la littérature, fait appel d'abord à la préparation d'une poudre acétonique à partir du raisin, puis une extraction de l'enzyme à partir de la poudre acétonique, enfin, une précipitation saline du milieu extrait par le sulfate de NH_4.

a) *Préparation de la poudre acétonique.*

Tenant compte du fait que les enzymes sont souvent mieux extraits lorsque l'on soumet les tissus à une congélation et un dégel ou à une série de congélations et dégels plusieurs fois consécutifs, nous sommes partis de 50 ou 100 grains suivant leur grosseur, après congélation à — 15°, puis dégel à la température du laboratoire. Après broyage dans un mixeur, durant 30 secondes, on ajoute un poids d'acétone égal à 8 à 9 fois le poids des grains mis en œuvre. L'acétone était auparavant séchée sur Cl_2Ca, redistillée et réfrigérée entre — 17° et — 20°. On broie à nouveau 30 secondes. Le tout est filtré sous vide sur un entonnoir Büchner réfrigéré à — 14°. La poudre de raisin parfaitement blanche ou légèrement jaune, débarrassée de la plus grande quantité des polyphénols du raisin est mise à sécher 2 à 3 heures, sous vide à une température relativement basse, 5° à 10°. Ces poudres sont mises en flacon bouché et conservé au frigorifique.

Au cours du broyage, en particulier des raisins verts avant maturité, la grande acidité du jus obtenu inactive partiellement les enzymes présents. Tenant compte du

fait signalé par Joslyn et coll. que la polyphénoloxydase est mieux extraite par les solutions alcalines, nous avons ajouté avant broyage des 50 ou 100 grains, une solution de KOH concentrée, calculée à partir d'un autre lot de 50 à 100 grains permettant de neutraliser au pH 7 environ (6,8 à 7,2) les acides qui sont libérés au cours du broyage des cellules. De cette façon nous avons limité l'inactivation consécutive au contact des protéines libérées contenant l'enzyme, avec un jus dont le pH est pour les raisins de l'ordre de 2,8.

b) *Extraction et précipitation de l'enzyme.*

Cinq à dix grammes de poudre acétonique de raisin sont broyés dans un mortier avec le double de leur poids de sable de Fontainebleau (silice) ou de poudre de verre pyrex en une poudre très fine, dans une salle à 0°. Cette poudre est reprise par 200 ml de tampon phosphate M/50 à pH 7,4, dans un flacon que l'on agite mécaniquement pendant 3 heures dans la salle à 0°. On centrifuge ensuite toujours à 0° à 10 000 *g*. On recueille environ 155 ml de liquide de cette première extraction. Le culot est repris à nouveau par 200 ml de tampon phosphate M/50, pH 7,4 et l'on a une deuxième extraction. On a aussi mesuré le pourcentage de l'extraction de l'enzyme et effectué une troisième et quatrième extraction.

Sur les volumes de liquide correspondant à chaque extraction, ou sur les extractions réunies, on précipite les enzymes par le sulfate de NH_4 juste avant saturation à la température de 0° (70 g pour 100 ml de liquide). On laisse reposer une nuit (18 à 24 heures) à 0°. On centrifuge à nouveau (12 000 *g*) et on reprend l'enzyme dans 10 ou 20 ml de tampon phosphate M/50, pH 7,4. On conserve à la glacière.

En vue d'une purification plus poussée on a effectué une dialyse contre de l'eau bidistillée durant une nuit et reprécipité l'enzyme une deuxième fois. Cette purification très longue n'a pas été l'objet pour notre étude d'une poursuite systématique. De plus, nous avons constaté la diminution de l'activité. Les résultats donnés par la première suspension d'enzymes nous ayant donné satisfaction pour l'étude que nous avons entreprise.

Le dosage des protéines est effectué sur une dilution de solution enzymatique selon la méthode spectrophotométrique de Warburg et Cristian, par la mesure de densité optique à 260 mμ et 280 mμ. Les chiffres trouvés sont de 0,6 à 1,35 mg de protéine par ml de solution d'enzyme.

B — *Mesure de l'activité enzymatique*

L'activité d'une polyphénoloxydase est habituellement mesurée par la méthode manométrique, qui donne directement la quantité d'oxygène fixé. Cependant en raison de l'inactivation assez rapide de l'enzyme, cette méthode a été critiquée. Dawson, Miller et coll. (1944) ont proposé une méthode basée sur le temps pour oxyder une quantité définie d'acide ascorbique. Ponting et Joslyn (1948) ont proposé une méthode colorimétrique plus simple, comparable, d'après les auteurs, en précision et reproductibilité, aux meilleures méthodes proposées. C'est celle que nous avons adoptée et mise au point en fonction des appareils utilisés dans notre laboratoire.

Elle est basée sur la mesure spectrophotométrique du développement dans le

temps de la coloration jaune due à l'oxydation du catéchol (diphénol *ortho*) en orthoquinone, par l'oxygène de l'air en présence de polyphénoloxydase ; dans ce cas, l'enzyme fonctionne comme « orthodiphénolase », Les conditions de pH fixées à 5 et la température à 20°. Voici comment nous avons adapté la méthode :

Dans un tube à essai on pipette :

— 1 ml de catéchol 0,5 M ;

— 10 ml de tampon acétique M/100 pH 5 ;

— 0,5 ml de solution d'enzyme. Temps de départ zéro d'un chronomètre — (très important).

— On agite le tube ouvert 1'30'' — 2'.

On remplit les cuves d'un colorimètre de 1 cm d'épaisseur (dans notre cas le spectrophotomètre Jobin et Yvon).

A partir de 2 minutes ou 3 on marque toutes les trente secondes la valeur des densités optiques obtenues à 4 200 Å. La cuve témoin contient les mêmes éléments sauf l'enzyme qui est remplacé par l'eau (ou du jus bouilli).

Dans le cas d'une activité enzymatique très élevée, on peut faire la lecture toutes les 10 secondes. Il est bon de tester l'enzyme à plusieurs dilutions. Les solutions diluées donnant de très bons résultats pendant 15' permettent de faire des lectures toutes les minutes et d'avoir ainsi le temps suffisant de faire les mesures. Dans la méthode de JOSLYN les proportions sont doublées, soit : 2 ml de catéchol, 0,5 M, 20 ml de tampon acétique M/100 pH 5 et 1 ml d'enzyme. Nous n'avons pas observé de différence lorsque la minipulation est bien menée.

RÉSULTATS

La figure 1 donne les résultats d'un essai avec 0,5 — 0,2 et 0,1 ml d'enzymes montrant la proportionnalité des concentration d'enzymes.

L'enzyme a été préparé à partir de raisins de *Carignan noir* 15 jours avant maturité. La proportionnalité de la concentration de l'enzyme est respectée dans la limite des erreurs expérimentales.

Toutefois, pour les concentrations en enzymes assez fortes, 0,2 ml et 0,5 ml, on voit à partir de la 10e minute que la coloration se ralentit. Ceci est en relation avec le fait plusieurs fois signalé de l'inactivation rapide de l'enzyme. Ceci est un inconvénient de la méthode si on n'exécute pas les mesures rapidement, mais c'est un avantage par rapport à d'autres méthodes où la mesure est effectuée après un temps défini.

On peut en effet ramener l'activité de l'enzyme que l'on teste à la partie proportionnelle de la courbe, au départ, et partant avoir une idée plus exacte de l'activité avant que l'inactivation n'intervienne.

Cette technique, telle qu'elle vient d'être décrite, ne permet pas de déterminer directement la quantité d'oxygène fixé. Cependant, comme dans la méthode chronométrique de DAWSON et coll. (1944). on peut, en ajoutant une quantité connue d'acide ascorbique au milieu, avoir une idée de l'oxygène consommé dans la réaction.

La figure 2 donne les résultats d'une expérience conduite de la façon suivante :

	Témoin	Essai 1	Essai 2	Essai 3
Catéchol 0,5 M (en ml)	1	1	1	1
Tampon acétique, pH 5 (en ml)..	8	8	8	8
Enzyme (en ml)		0,4	0,4	0,4
Acide ascorbique M/200 (en ml)			0,2	0,4
H_2O (en ml)	1	0,6	0,4	0,2

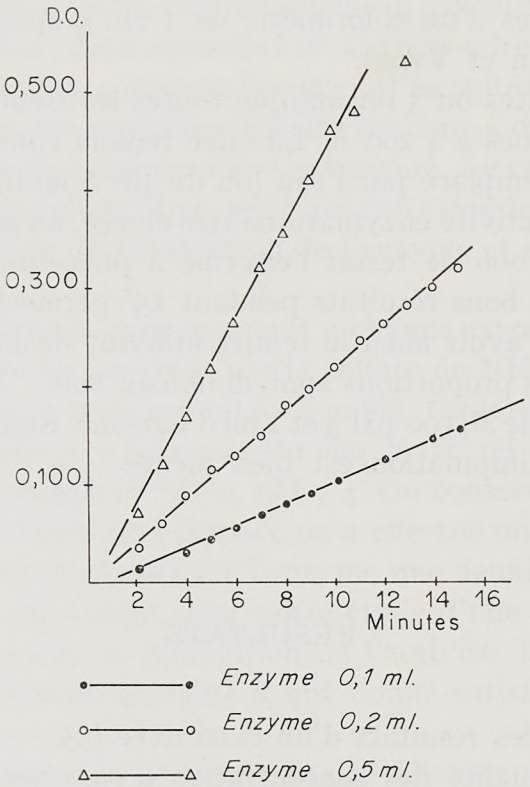


Fig. 1

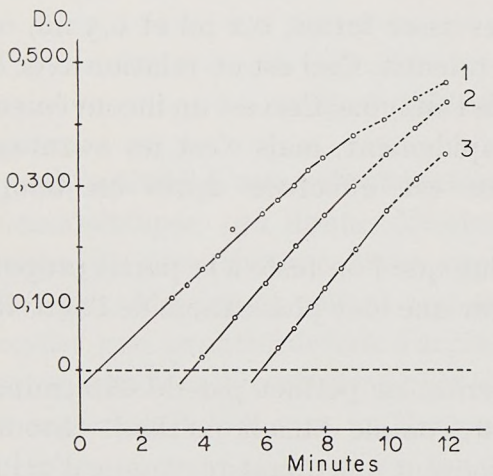


Fig. 2

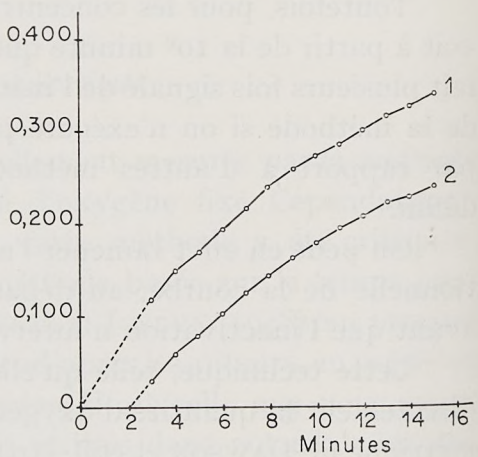


Fig. 3

On voit que le retard imprimé au développement de la coloration est proportionnel à la quantité d'acide ascorbique ajouté.

Dans l'expérience considérée, on peut calculer que 176 γ d'acide ascorbique ont été oxydés en 2', pour 10 ml du mélange réactionnel, soit une oxydation de 8,8 γ d'acide ascorbique par minute et par ml, ou bien une fixation de 0,56 mm^3 d'oxygène par ml de milieu et par minute.

L'unité d'activité de la « catécholase » ayant été définie comme étant la quantité d'enzyme qui cause une fixation de 10 µl d'oxygène par minute, on voit que par cette technique on peut exprimer les résultats en unités d'activité.

C — *Mesure de l'activité enzymatique sur le jus de raisin*

Pour comparer plusieurs cépages, au point de vue de leur activité enzymatique cette technique comportant une extraction de l'enzyme s'avérait longue et peu pratique. On a donc essayé de mesurer directement cette activité sur le jus lui-même, ou sa dilution.

Partant d'un jus obtenu par broyage d'un certain nombre de baies puis centrifugé, nous avons observé que pour une même dilution dans un mélange tampon (phosphate M/20, pH 7), on obtenait des activités très différentes. Ces activités mesurées à partir de dilutions différentes, mais de concentrations identiques du même jus, n'étaient pas constantes. Ce phénomène n'était pas nécessairement dû à une perte d'activité de l'enzyme dans le temps, puisque certains essais effectués sur un même jus après 4 heures de repos dans la glace avaient une activité plus élevée qu'au départ.

a) *Influence de la centrifugation.*

Après broyage rapide au mixeur d'un certain nombre de grains de raisins, soit 30 secondes à 8 000 tours et 30 secondes à 12 000 tours, le broyat était centrifugé à différentes accélérations à l'aide d'une centrifugeuse réfrigérée. Pour les grandes accélérations supérieures à 6 000 *g* la perte de l'activité « orthodiphénolasique » est totale. A 3 000 *g* elle est encore très importante. Pour avoir une activité mesurable nous nous sommes arrêtés au mode opératoire suivant :

1° Broyage des grains 30 secondes à 8 000 tours + 30 secondes à 12 000 tours ;
2° Centrifugation à 1 500 *g* d'une durée de 6 minutes, comprenant :

3 minutes pour arriver à l'accélération désirée ;
2 minutes à 1 500 *g* ;
1 minute (temps de freinage et arrêt).

3° Les contenus des tubes étaient filtrés sur étamine lâche, afin d'éliminer les particules solides surnageantes.

Avec ce mode opératoire nous avons obtenu à partir de différentes dilutions du même jus des activités sensiblement constantes.

Cette expérience nous montre que l'activité de la polyphénoloxydase est retenue avec les débris solides rassemblés dans le culot de centrifugation, comme nous l'avons constaté. Cette observation déjà signalée par d'autres auteurs (Oparine, 1963) est très importante et montre que pour effectuer des mesures comparatives le mode de préparation des jus mis en expérience est très important et doit être précisé.

Avec le mode opératoire adopté la figure 3 représente les deux courbes avec et sans addition d'acide ascorbique au cours d'une expérimentation conduite comme suit :

	Témoin	Essai 1	Essai 2
Catéchol 0,5 M (en ml)	1	1	1
Tampon acétique pH 5 (en ml)....	9	9	9
Jus (dilué 10 fois) (en ml)		1	1
Acide ascorbique (M/500) (en ml) ..			0,5
H_2O	2	1	0,5

On peut observer que le phénomène d'inactivation de l'enzyme est très apparent, même dans l'essai supplémenté en acide ascorbique, montrant que ce phénomène n'est pas exclusivement dépendant de la formation des produits de l'oxydation des phénols.

Toujours avec le même mode opératoire adopté, nous avons comparé l'activité du jus de plusieurs cépages. Comme terme de comparaison nous avons calculé l'accroissement de densité optique à 420 mμ en 10 minutes entre la 3e et la 13e minute. Voici les résultats trouvés :

Carignan blanc.....	0,180
Terret blanc	0,225
Grenache blanc.....	0,382
Maccabeo	0,443

Nous voyons que les cépages réputés oxydables dans la pratique comme le *Grenache* et le *Maccabeo*, ont aussi l'accroissement de densité optique le plus élevé.

b) *Influence du pressurage et de la centrifugation.*

Dans la pratique ordinaire les jus ne sont pas centrifugés à la sortie du pressoir et il nous a semblé intéressant de comparer les valeurs trouvées avec le mode opératoire standardisé au laboratoire et le jus de presse s'écoulant d'un pressoir ordinaire, en opérant avec ces deux techniques sur un même lot de raisins.

Augmentation de la D.O. à 420 mμ en 10′

	Procédé standard (broyé et centrifugé)	Pressoir ordinaire
Carignan blanc.....	0,180	0,576
Terret blanc	0,225	0,364
Grenache blanc.....	0,382	0,670
Maccabeo	0,443	0,614

L'influence de la centrifugation est très nette. Un jus de pressoir entraînant toujours des débris pulpeux est beaucoup plus oxydable enzymatiquement. Cependant, comme la répartition dans le jus de ces débris ou granules, supports d'une certaine activité enzymatique, est assez hétérogène, il semble aléatoire de faire des mesures comparatives d'oxydabilité enzymatiques dans ces conditions, comme nous l'avons signalé précédemment.

c) *Influence de la couleur du cépage.*

Sur certains cépages, comme le *Grenache* et le *Carignan*, possédant les trois variétés *blanc, rosé et noir*, nous avons testé, avec la même méthode, leur indice d'oxydabilité enzymatique.

Les essais ont été effectués sur les jus dilués au 1/5 avec le tampon pH 7.

Augmentation de la D.O. à 420 mμ en 10′ :

Grenache blanc	0,296
Grenache rosé	0,132
Grenache noir	0,210
Carignan blanc	0,103
Carignan rosé	0,235
Carignan noir	0,540

Pour le *Grenache*, c'est le blanc qui a l'indice d'oxydabilité le plus élevé, pour le *Carignan* ce serait l'inverse. Les essais demanderont à être multipliés pour se faire une opinion. Toutefois, il semble que la méthode de testage soit valable quelle que soit la couleur du cépage. En effet, aux dilutions où l'on opère l'influence de la couleur du cépage est négligeable, par rapport à celle développée par le catéchol.

d) *Influence des moisissures.*

L'expérience a été réalisée sur les grains du cépage *Clairette*. On a séparé sur les mêmes grappes les grains sains et les grains moisis et mesuré dans les mêmes conditions l'indice d'oxydabilité.

Augmentation de la D.O. à 420 mμ en 10′ :

Clairette grains sains	0,110
Clairette grains moisis	0,485

Les grains moisis ont une vitesse d'oxydation quatre fois plus grande environ que les grains sains. Le fait était bien connu auparavant mais la méthode testée permet de mieux apprécier le phénomène. Cette exaltation de l'oxydabilité sous l'influence des moisissures paraît être à la fois très importante et mesurable.

e) *Influence de la fermentation.*

Au fur et à mesure que la fermentation du jus se poursuit, on voit l'activité polyphénoloxydasique diminuer pour devenir presque nulle à la fin de la fermentation. Ceci est explicable par le fait que la levure consomme ou dégrade les édifices protéiques dans le milieu, les protéines enzymatiques des oxydases ne semblent pas échapper à cette dégradation.

Augmentation de la D.O. à 420 mμ en 10′ :

	Fermentation		
	Début	Milieu	Fin
Clairette	0,150	0,063	0,016
Grenache	0,390	0,082	0,013

CONCLUSION

Par la technique que nous venons de décrire il a été possible d'isoler, dans une fraction protéique du raisin, un enzyme oxydant à activité « orthodiphénolasique ». Cette propriété rend compte généralement de la présence d'un enzyme à activité plus complète appelé polyphénoloxydase.

Une technique de mesure dérivée de la méthode colorimétrique de JOSLYN et PONTING a permis d'évaluer le pouvoir oxydant enzymatique de différentes variétés de jus de raisin, aussi bien colorés que blancs. Toutefois, pour effectuer des mesures comparatives correctes, le mode opératoire de préparation des jus testés mérite d'être standardisé en raison de la propriété de l'enzyme d'être fixé sur les particules (débris, granules ou mitochondries) que peut contenir le jus fraîchement préparé.

Reçu pour publication en février 1966.

SUMMARY

POLYPHENOLOXIDASE IN GRAPES

Using a modification of PONTING and JOSLYN's method, a study was carried out on the amount of « orthodiphenolase » enzyme activity. This estimate, combined with one derived from the oxidation of a known quantity of ascorbic acid, made it possible to calculate the oxygen taken up in the course of the reaction.

The influence of various factors (variety, pigmentation, centrifugation, and moulds) was studied by determining the activity directly on different grape juices.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BRAVERMAN J. B. S., 1963. *Introduction to the biochemistry of Foods.* Elsevier Publishing Comp., 298-300.

DAWSON C. R., MILLER W. H., MALLETTE M. F., ROTH L. J., 1944. *J. amer. Chem. Soc.*, **66**, 514.

DAWSON C. R., TARPLEY W. B., 1951. *Copper Oxidases. The Enzymes*, **11**, 454-498.

DEIBNER L., RIFAI H., 1963. *a* Die Polyphenoloxydase im Traubensaft. *I. Mitteilungen Serie A*, n° 2, 56-70.

DEIBNER L., RIFAI H., 1963. *b* Die Polyphenoloxydase im Traubensaft. *II. Mitteilungen Serie A*, n° 3, 113-119.

OPARINE, 1963. *Bull. O. I. V.*, **36**, 1301-1310.

PONTING J., JOSLYN M. A., 1948. Ascorbic acid oxidation and Browning in apple tissue extracts. *Arch. Biochem.*, **19**, 47-63.

Ann. Technol. agric., 1966, **15** (2), 159-171.

CARACTÉRISATION DES COMPOSÉS CARBONYLÉS ET DOSAGE DE L'ACÉTALDÉHYDE DANS CERTAINS VINS PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

Lucette ANDRÉ

Station de Technologie végétale, route de Saint-Cyr, 78 – Versailles

SOMMAIRE

Par traitement direct du vin par l'hydroxylamine, suivi d'une extraction à l'éther, on obtient les oximes des aldéhydes et cétones de la série aliphatique ; ces oximes peuvent être chromatographiées en phase gazeuse et l'identification des composés carbonylés est ainsi facilitée. Cette méthode permet le dosage de l'acétaldéhyde.

L'oximation a été également utilisée comme « méthode par différence » pour reconnaître certains autres corps possédant un groupe aldéhydique ou cétonique, ainsi que pour les lactones.

On n'a pas trouvé dans les vins étudiés d'autre aldéhyde aliphatique que l'acétaldéhyde, mais on a pu caractériser sur les chromatogrammes le furfural, l'acétoïne et la γ-butyrolactone.

INTRODUCTION

Pour l'identification des substances séparées par chromatographie en phase gazeuse, la formation de dérivés est une méthode particulièrement précieuse. La comparaison de chromatogrammes exécutés sur des extraits n'ayant pas subi de traitement spécial, et sur les extraits correspondants dans lesquels on a pu effectuer les dérivés de certains groupes de substances, donne des indications sur la nature des corps séparés, grâce à la disparition de certains pics et à l'apparition éventuelle de nouveaux pics.

Nous avons cherché à identifier les aldéhydes présents en quantité importante dans certains vins spéciaux (vins jaunes du Jura, Madère), et exprimés habituellement en acétaldéhyde par les méthodes de dosage courantes. Ceci nous a amené à étudier les composés carbonylés les plus volatils et conduit à mettre au point une méthode de dosage de l'acétaldéhyde.

La caractérisation directe de l'acétaldéhyde est rendue difficile par son faible temps de rétention, et par le fait qu'il est souvent masqué par les corps de faible point d'ébullition, solvants ou produits légers de la fermentation. De plus, il peut être perdu en partie ou totalement au cours du traitement nécessaire à la préparation des extraits, et subir des altérations par passage sur certaines colonnes. En dehors de la formation de dérivés insolubles et de leur chromatographie sur plaque ou sur papier, en particulier des 2,4-dinitrophénylhydrazones, plusieurs méthodes ont été proposées pour la chromatographie en phase gazeuse de dérivés ou de complexes des aldéhydes et cétones. RALLS (1960) procède, par la méthode de *flash exchange* avec l'acide α-cétoglutarique, à la régénération à l'entrée de la colonne des aldéhydes combinés avec la 2,4-dinitrophénylhydrazine. SOUKUP et *al.* (1964) chromatographient les 2,4-dinitrophénylhydrazones en solution benzénique. Mais ces méthodes demandent une séparation préliminaire. D'autre part, la méthode de STANLEY et *al.* (1961), utilisant le réactif de Girard, permet la chromatographie directe des dérivés des aldéhydes, mais elle est longue et nécessite l'emploi et la purification de quantités importantes de solvants.

La méthode d'oximation de CASON et HARRIS (1959) est très simple et peut se faire sans aucune distillation préalable : les aldéhydes sont transformés en oximes et celles-ci sont chromatographiées directement. La méthode d'oximation a été également utilisée par BASSETTE et *al.* (1963) pour l'analyse du lait, mais ces auteurs, effectuant l'analyse de l'atmosphère gazeuse surmontant les échantillons, ne l'ont utilisée que comme méthode par différence, pour éliminer les pics des aldéhydes et cétones.

Nous avons donc utilisé cette méthode, d'une part pour la recherche des aldéhydes et cétones du vin, d'autre part pour la caractérisation et le dosage de l'acétaldéhyde. Pour vérifier les résultats quantitatifs obtenus par cette méthode, nous avons effectué parallèlement le dosage de l'acétaldéhyde par la méthode colorimétrique de FROMAGEOT et HEITZ (1938).

I. — MÉTHODES

A. — *Méthode chromatographique*

1° *Appareil.*

Nous avons utilisé un Aerograph à ionisation de flamme, modèle HY-FI 600. Les conditions étaient les suivantes :

- Colonne : 10′, de diamètre 1/8″, remplie de Chromosorb W 60-80 lavé à l'acide et imprégné de 10 p. 100 de DEGS.
- Gaz vecteur : azote.
- Pression : 20 psig.
- Débit : 35,4 ml/mn.
- Température : programmée de 60 à 150°C à la vitesse de 4°/mn.

2° *Préparation des oximes.*

CASON et HARRIS (1959) indiquent, pour les aldéhydes de C_2 à C_4, la méthode suivante : les substances volatiles des tissus végétaux sont entraînées à la vapeur d'eau ; on effectue l'oximation des aldéhydes et des cétones en solution aqueuse par le chlorhydrate d'hydroxylamine et le carbonate de sodium ; les oximes sont ensuite entraînées par extraction continue à l'éther, la solution

éthérée est séchée et concentrée, et l'extrait étudié par chromatographie en phase gazeuse sur colonne de di-2-éthyl-hexylphtalate. Nous avons adapté la méthode aux vins de la manière suivante :

a) *Pour l'étude des composés carbonylés du vin.*

300 ml de vin sont neutralisés et additionnés de 41,6 g de chlorhydrate d'hydroxylamine. Après dissolution, on ajoute 31,8 g de CO_3Na_2 anhydre. On laisse une nuit en contact,et on extrait par 5 fractions successives de 75 ml d'éther. On sèche sur le minimum de SO_4Mg anhydre, et l'éther est distillé ; on mesure le volume du résidu de distillation, et on en chomatographie un volume connu. Il est parfois utile de reprendre la distillation pour chasser une partie de l'alcool et faire mieux apparaître les corps se trouvant à l'état de traces.

D'autre part, 300 ml de vin sont neutralisés, additionnés de sel (70 g de ClNa) afin de les amener à une concentration saline voisine de celle de l'échantillon oximé ; on procède à une extraction dans les mêmes conditions et on chromatographie un volume connu. Les chromatogrammes du vin et du vin oximé sont alors comparés.

La neutralisation du vin a pour but d'éviter l'extraction des substances acides qui sans cela risqueraient d'apparaître sur le chromatogramme de l'échantillon témoin, et non sur l'échantillon oximé, par suite de l'action de CO_3Na_2. L'acétal est hydrolysé par le chlorhydrate d'hydroxylamine.

b) *Pour le dosage de l'acétaldéhyde.*

Dans le cas de nos vins très riches en aldéhydes, on peut ne traiter qu'un volume de vin très inférieur. Nous avons procédé de la manière suivante : 25 ml de vin sont additionnés de 3,47 g de chlorhydrate d'hydroxylamine (soit 50 mM), puis 2,65 g de CO_3Na_2 anhydre (soit 25 mM). On laisse reposer une nuit et le vin oximé est extrait par 5 fois 25 ml d'éther. Les extraits éthérés sont réunis et évaporés jusqu'à un volume connu ; le séchage pour ce faible volume ne s'est pas montré nécessaire, les traces d'eau ne gênant pas la chromatographie si l'on dispose d'un détecteur à ionisation de flamme, et le desséchant (SO_4Mg) ayant parfois provoqué des pertes au cours des essais préliminaires. Pour des vins de faible teneur en aldéhydes, on peut augmenter le volume de la prise d'essai et la quantité correspondante de réactifs.

B — *Méthode colorimétrique*

L'appareil employé est le photocolorimètre de Bausch et Lomb.

Nous avons utilisé la méthode de Fromageot et Heitz (1938), basée sur la coloration bleue obtenue en présence de pipérazine et de nitroprussiate : 2 ml de la solution à analyser, ou une quantité moindre, contenant de 50 à 400 µg d'acétaldéhyde, sont additionnés d'eau jusqu'à un volume de 6 ml, et distillés dans un appareil à semi-microdistillation ; 2 ml de distillat sont recueillis dans 3 ml d'eau glacée. On ajuste à 6 ml et on ajoute 1,5 ml de solution saturée de pipérazine et 0,5 ml de solution de nitroprussiate de sodium à 4 p. 100. On lit au colorimètre à 550 mµ l'intensité de la coloration, qui passe par un maximum au bout de 2 ou 3 mn. Une courbe d'étalonnage a été établie avec une solution d'acétaldéhyde dans l'alcool à 95°.

II. — RÉSULTATS

A. — Oximation des composés carbonylés en solution pure

Nous avons constaté que la méthode de Cason et Harris (1959), appliquée par ces auteurs aux adéhydes et cétones de C_2 à C_4, convient également aux termes de poids moléculaire plus élevé de la série aliphatique. Nous avons étudié les aldéhydes de C_2 à C_8, les cétones de C_3 à C_5 ; leurs oximes sont volatiles et peuvent donc apparaître dans les chromatogrammes d'extraits de vins oximés. Le rapport de la hauteur des pics d'aldéhydes et de cétones et de leurs oximes est variable, il est de 20 à 30 p.100

dans le cas des aldéhydes, de 50 à 70 p. 100 dans le cas des cétones. Cette différence est due en partie au fait que les oximes ont un point d'ébullition beaucoup plus élevé que les aldéhydes et cétones correspondants, et sortent légèrement étalées et plus tardivement sur les chromatogrammes.

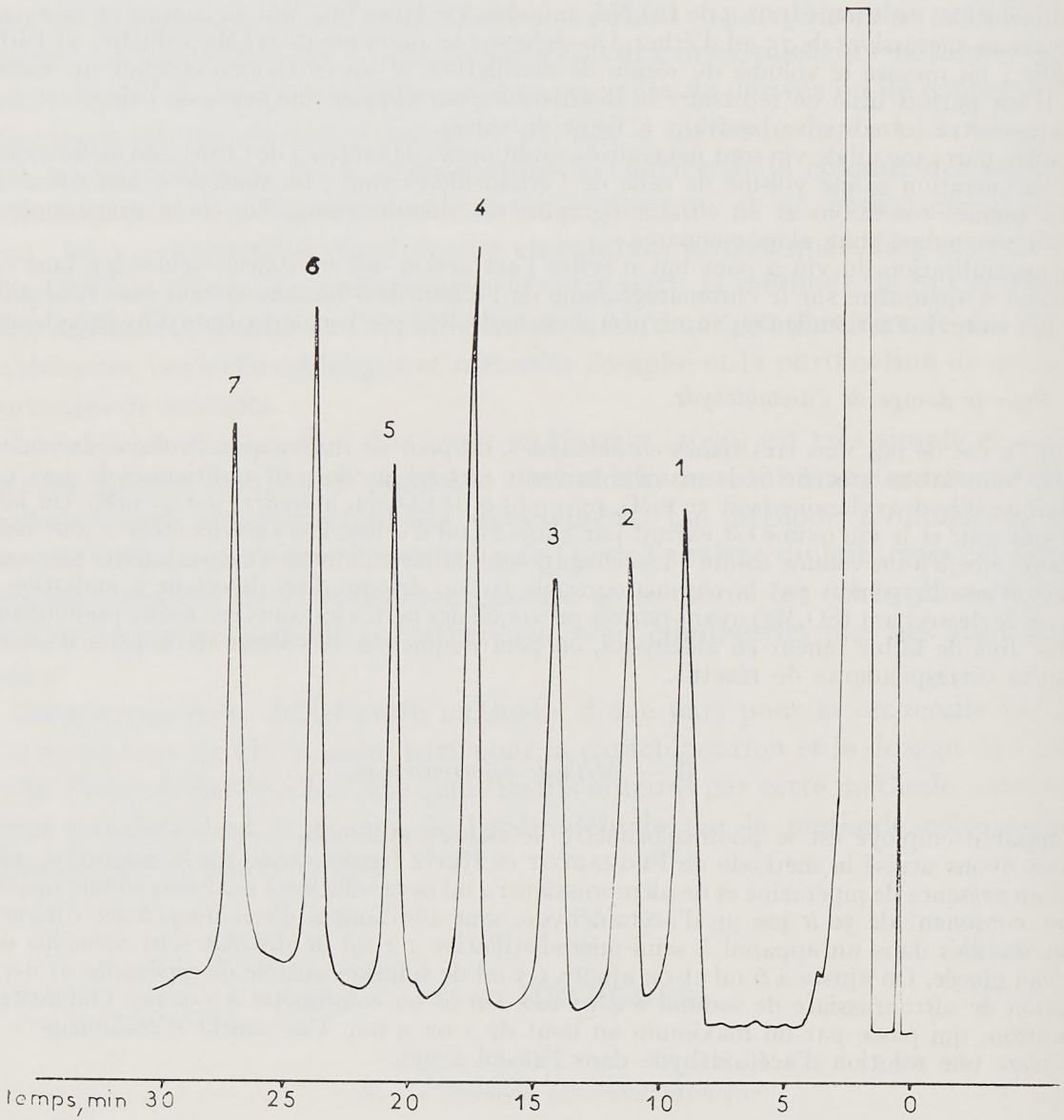


FIG. 1. — *Oximation des aldéhydes*

1 : acétique 2 : propionique 3 : butyrique 4 : valérianique
5 : hexylique 6 : heptylique 7 : octylique

L'oximation en tant que méthode par différence peut servir à caractériser d'autres substances qui réagissent avec l'hydroxylamine, mais dont les oximes ne sont pas assez volatiles pour apparaître sur les chromatogrammes, ou sont décomposées. LOHR et WARREN (1962) ont effectué l'oximation de l'aldéhyde benzoïque et de l'aldéhyde salicylique et la chromatographie de ces oximes, et ont constaté que celles-ci subissaient une transformation plus ou moins complète en nitriles.

Dans le tableau suivant, on trouvera la liste des substances que nous avons étudiées, les unes donnant des pics d'oximes volatiles, les autres n'en donnant pas, mais ayant disparu sous l'effet de l'oximation.

Corps donnant un pic d'oxime	Corps disparaissant par oximation sans donner de pic net
Aldéhyde acétique	Hexénal
Aldéhyde propionique	Aldéhyde benzoïque
Aldéhyde butyrique	Aldéhyde salicylique
Aldéhyde valérianique	Aldéhyde cinnamique
Aldéhyde hexylique	Aldéhyde phényl-éthylique
Aldéhyde heptylique	Furfural
Aldéhyde octylique	Diacétyle
Aldéhyde isobutyrique	Acétoïne
Aldéhyde isovalérianique	Acroléine
Acétone	Lactones { γ-butyrolactone
Butanone	ambrettolide
Pentanone	
Acétal (se comporte comme l'acétaldéhyde)	

A titre d'exemple, sont donnés les chromatogrammes des oximes des aldéhydes de C_2 à C_8 de la série *n* (fig. 1), ainsi que ceux de l'acétone, de la butanone et de la pentanone (fig. 2).

B. — Caractérisation des composés carbonylés du vin

En plus de l'acétaldéhyde et de l'acétal, plusieurs aldéhydes ont été signalés dans le vin : par Bayer (1957), les aldéhydes propionique, butyrique, valérianique, hexylique, et des traces d'aldéhydes supérieurs, l'aldéhyde valérianique étant, après l'acétaldéhyde, celui des composés carbonylés trouvé à la plus forte concentration ; par Mecke et *al.* (1960), les aldéhydes isobutyrique, isovalérianique, hexylique, cinnamique ; par Rodopoulo et Egorov (1965), le formol, les aldéhydes propionique, isobutyrique, isovalérianique, hexylique et énanthique, en partie combinés à l'état d'acétals. En revanche, Webb et *al.* (1962, 1964), dans leurs travaux récents, n'ont trouvé que l'acétaldéhyde seul et, dans le cas du sherry, un composé non identifié.

Nous avons étudié, d'une part plusieurs échantillons de Château-Châlon, vin connu pour sa forte teneur en aldéhydes ; d'autre part un vin de type oxydé (Madère). Le seuil de détection des aldéhydes et cétones aliphatiques est de l'ordre de quelques mg/l, ce que nous avons vérifié en faisant l'oximation d'un vin auquel avaient été ajoutés environ 15 mg/l des aldéhydes de C_3 à C_8 (fig .3). D'après le chromatogramme de la figure 3, on voit qu'on pourrait déceler : environ 5 mg /l des aldéhydes propionique, butyrique et octylique, 2 mg /l de l'aldéhyde valérianique, mieux séparé ; les aldéhydes hexylique et heptylique ne peuvent, dans le cas particulier du vin étudié, être mis en évidence qu'après une comparaison attentive avec le chromatogramme du vin non oximé, en raison de l'interférence de leurs pics avec les pics voisins, dans nos conditions expérimentales. Le pic d'oxime de l'acétaldéhyde correspond ici à une teneur de 35 mg /l environ d'acétaldéhyde.

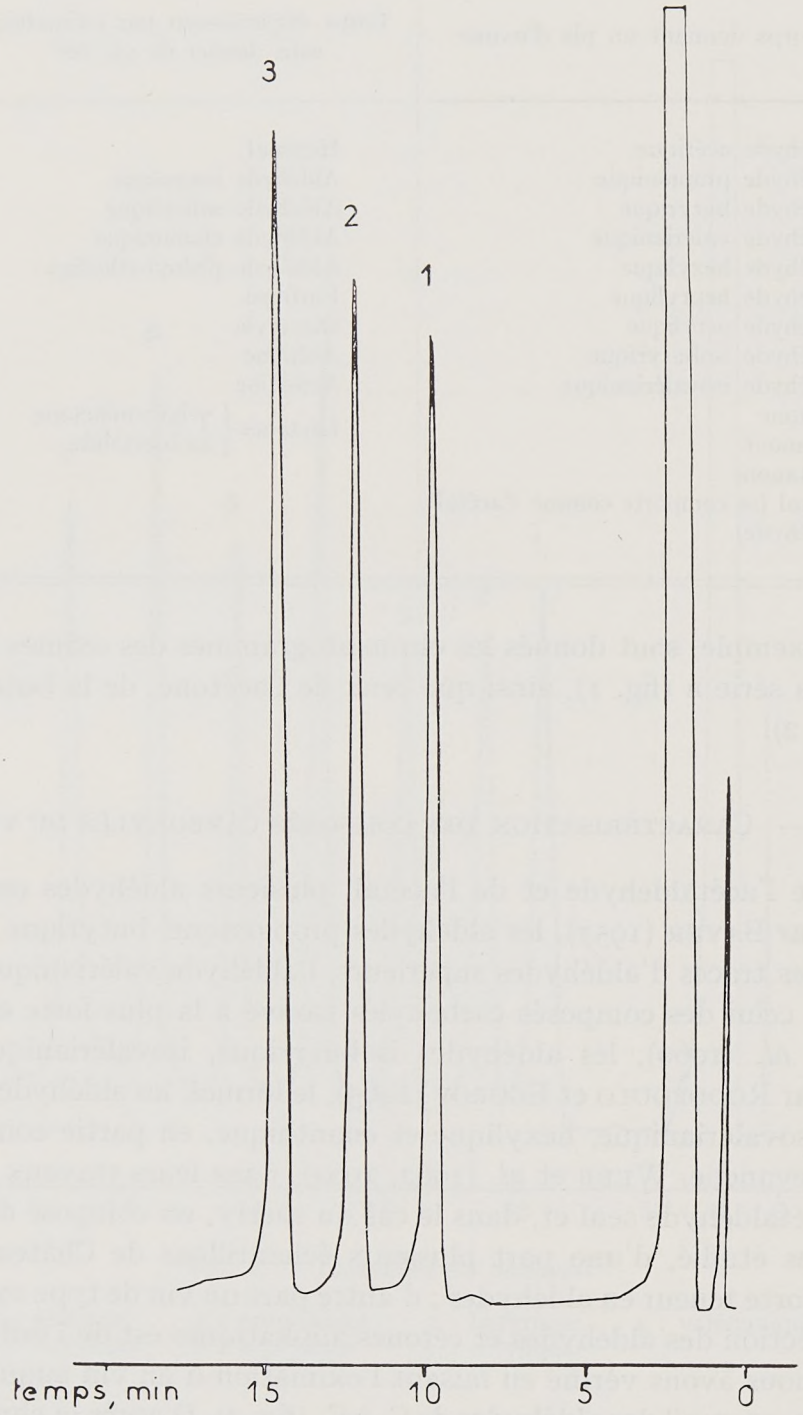


FIG. 2. — *Oximation des cétones*

1 : acétone 2 : butanone 3 : pentanone.

Dans les vins étudiés nous n'avons pu mettre en évidence ni les aldéhydes aliphatiques de C_3 à C_8, ni les cétones aliphatiques de C_3 à C_5, à l'exception d'une faible quantité d'une substance dont le pic correspond soit à l'aldéhyde butyrique, soit à l'acétone, mais se trouvant en trop petite quantité pour permettre l'identification du pic d'oxime correspondant. Les aldéhydes aromatiques semblent également absents. Il est vrai que l'importance des pics de certaines substances risque de masquer

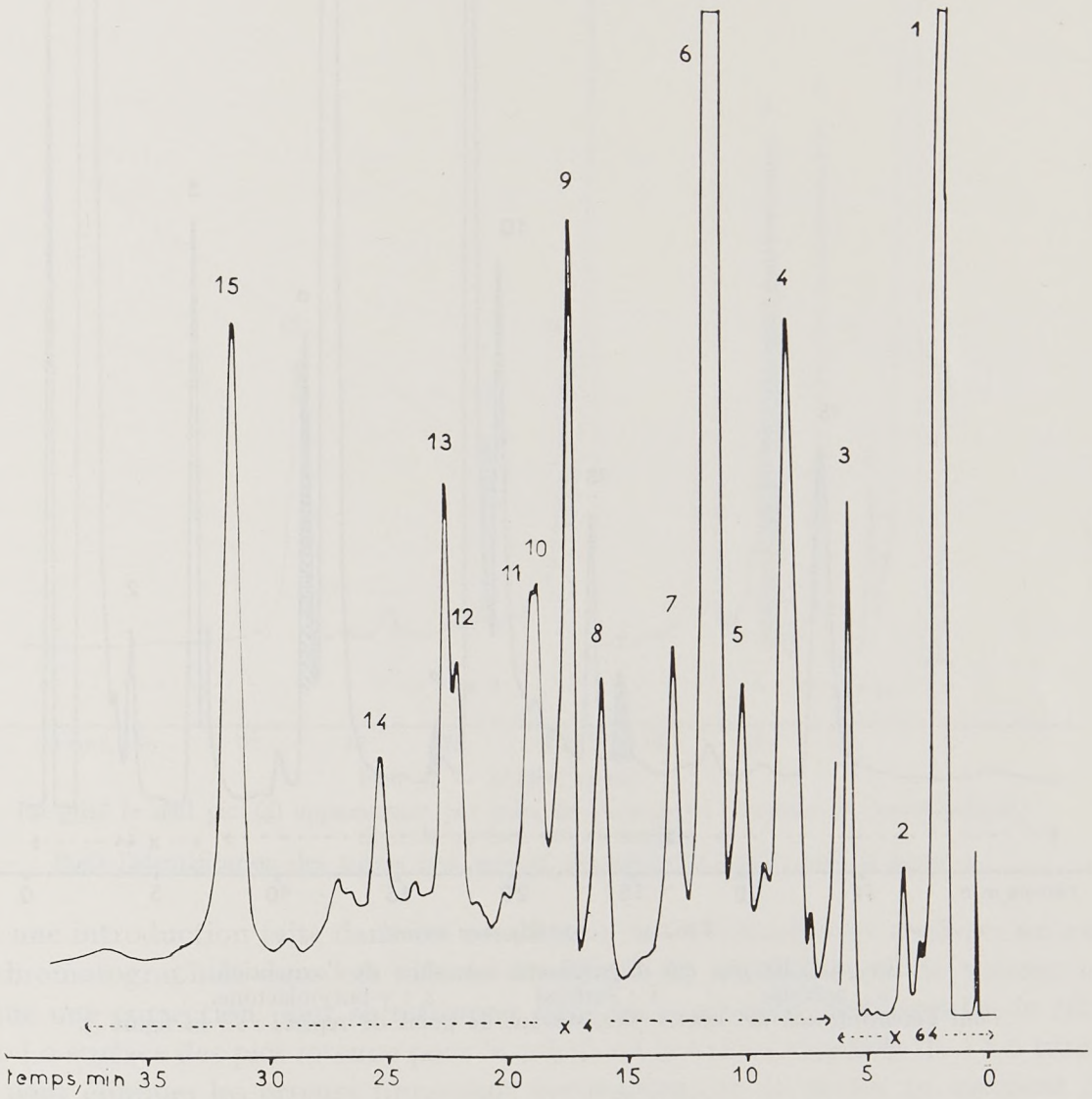


FIG. 3. — *Oximation d'un échantillon de Madère additionné d'aldéhydes de C_3 à C_8 (15 mg/l)*

1 : éthanol ; 2 : isobutanol ; 3 : isopentanols ; 4 : oxime de l'acétaldéhyde ; 5 : oxime de l'aldéhyde propionique ; 6 : lactate d'éthyle ; 7 : oxime de l'aldéhyde butyrique ; 8 : oxime de l'aldéhyde valérianique ; 9 : lactate d'isoamyle ; 10 : butylène glycol ; 11 : oxyme de l'aldéhyde hexylique ; 12 : oxime de l'aldéhyde heptylique ; 13 : succinate d'éthyle ; 14 : oxime de l'aldéhyde octylique ; 15 : alcool phényléthylique.

les pics d'oximes se trouvant en très faible quantité. En revanche, nous avons pu caractériser le furfural, l'acétoïne, la γ-butyrolactone et déceler la présence de diacétyle, quoique celui-ci soit entraîné avec l'éther au moment de la concentration des échantillons.

Les figures 4 et 5 représentent les chromatogrammes d'un vin non traité et du même vin oximé. On distingue sur la figure 5 le pic d'oxime de l'acétaldéhyde, et on remarque la disparition des pics d'acétoïne, de furfural et de γ-butyrolactone.

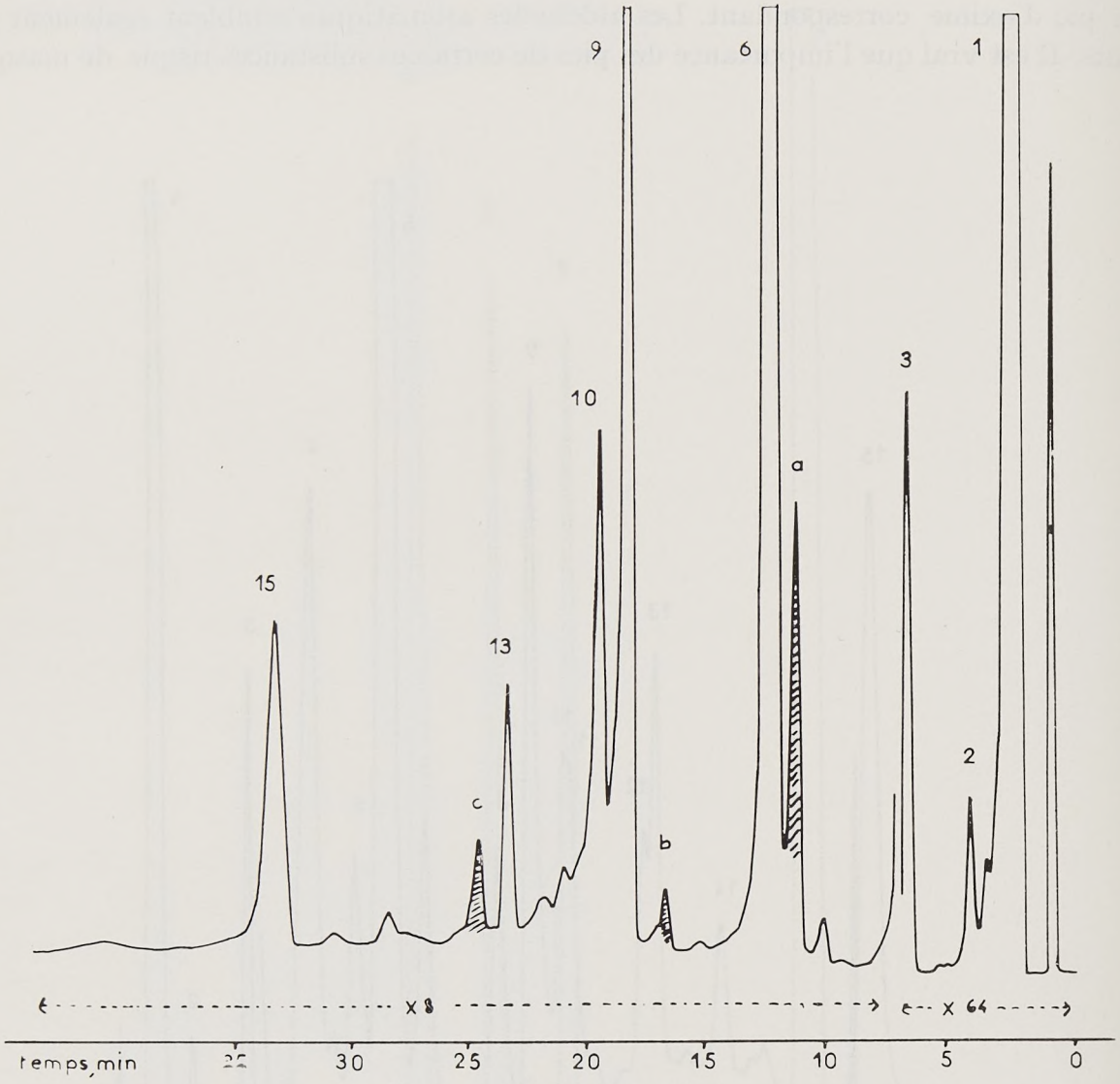


FIG. 4. — *Madère non oximé*

En grisé, les pics qui disparaissent à la suite de l'oximation :
a : acétoïne *b* : furfural *c* : γ-butyrolactone.
Pour l'identification des autres pics, servant de point de repère, voir la figure 3.

C. — DOSAGE DE L'ACÉTALDÉHYDE

1° *Établissement de la courbe d'étalonnage pour le dosage de l'acétaldéhyde*

La teneur en acétaldéhyde a été calculée d'après une courbe de référence obtenue avec une solution témoin d'acétaldéhyde. Des solutions contenant 8 ml d'eau, 2 ml d'alcool, et une quantité d'acétaldéhyde allant de 7,8 mg (soit 0,1 ml d'une solution à 10 p. 100 dans l'alcool) à 78 mg sont traitées par l'hydroxylamine et le carbonate de sodium selon la méthode décrite ci-dessus. Les extraits éthérés sont évaporés jusqu'à un volume connu (ici 4 ml). On injecte des volumes de 2,5 µl ou 5 µl, à des sensibilités de 1/16 ou 1/32 selon la teneur. La courbe est établie (fig. 6) en portant

en abscisse le nombre de mg d'acétaldéhyde par ml de l'échantillon concentré, et en ordonnée la surface en cm^2 (hauteur × largeur à demi-hauteur) du pic obtenu par l'introduction de 5 µl à une sensibilité de 1/16, ou la surface calculée pour correspon-

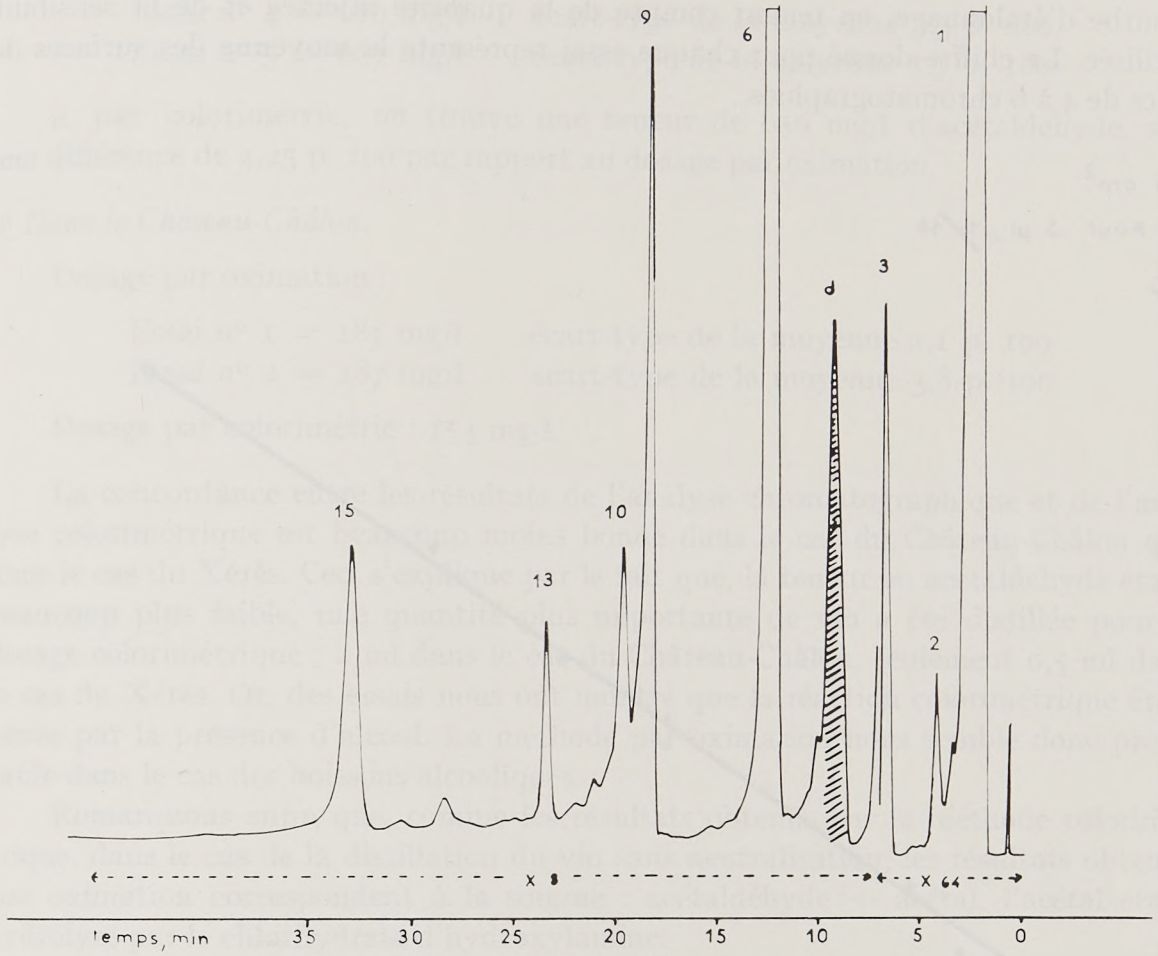


FIG. 5. — *Madère oximé.*
En grisé le seul pic (*d*) apparaissant par suite de l'oximation : l'oxime de l'acétaldéhyde, dont la surface est mesurable.
Pour l'identification des autres pics servant de points de repère, voir la figure 3.

dre à une introduction faite dans ces conditions. Si les échantillons analysés ne sont pas chromatographiés dans ces mêmes conditions de sensibilité ou de volume on effectue une correction pour se retrouver dans les conditions de la courbe de référence. La surface des pics retenue pour le calcul est la valeur moyenne de 4 à 6 résultats, pour éliminer les erreurs provenant éventuellement de pertes au moment de l'introduction.

2° Dosage de l'acétaldéhyde dans 2 vins

Nous avons effectué le dosage de l'acétaldéhyde dans 2 vins, d'une part par colorimétrie, d'autre part par oximation :

a) dans du Xérès : le dosage par oximation a été fait dans le vin tel quel et après addition d'acétaldéhyde afin de vérifier la précision de cette méthode.

b) dans du Château-Châlon.

Dans le cas du dosage par oximation, on chromatographie une quantité connue : le pic d'oxime de l'acétaldéhyde sort, dans les conditions ci-dessus, vers 9 mn, après

l'isopentanol, dont il est nettement séparé (fig. 5). La comparaison avec un échantillon de vin non oximé permet d'identifier ce pic, que nous avons trouvé ne se superposer à aucun autre dans les vins étudiés.

La surface du pic d'oxime est mesurée, et la surface obtenue rapportée à la courbe d'étalonnage, en tenant compte de la quantité injectée et de la sensibilité utilisée. Le chiffre donné pour chaque essai représente la moyenne des surfaces des pics de 4 à 6 chromatographies.

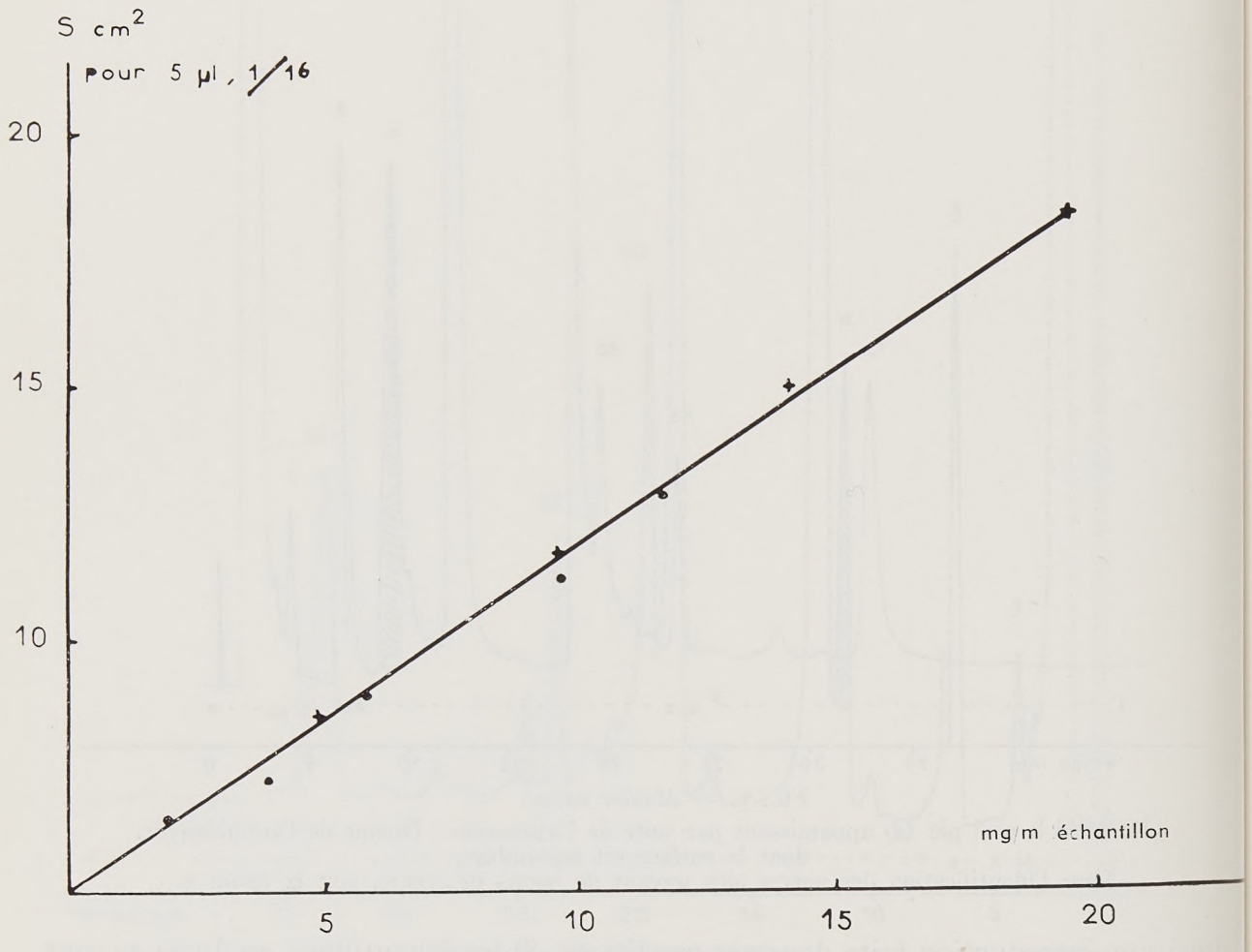


FIG. 6. — *Courbe d'étalonnage pour le dosage de l'acétaldéhyde*

Les résultats obtenus sont les suivants :

a) *Dans le Xérès.*

Dosage par oximation de l'acétaldéhyde présent dans le vin :

Essai n° 1 = 472 mg/l écart-type de la moyenne 1,6 p. 100
Essai n° 2 = 475 mg/l écart-type de la moyenne 3,3 p. 100
Essai n° 3 = 460 mg/l écart-type de la moyenne 3,6 p. 100

soit en moyenne 469 mg/l.

Quantité d'acétaldéhyde ajoutée :

4,72 mg dans 25 ml, soit 189 mg/l

La teneur globale est donc de : 469 + 189 = 658 mg/l.

Dosage de la quantité globale d'acétaldéhyde :

1. par oximation :

Essai n° 4 = 670 mg/l écart-type de la moyenne 3,3 p. 100
Essai n° 5 = 667 mg/l écart-type de la moyenne 1,7 p. 100

2. par colorimétrie, on trouve une teneur de 650 mg/l d'acétaldéhyde, soit une différence de 4,25 p. 100 par rapport au dosage par oximation.

b) *Dans le Château-Châlon.*

Dosage par oximation :

Essai n° 1 = 187 mg/l écart-type de la moyenne 2,1 p. 100
Essai n° 2 = 187 mg/l écart-type de la moyenne 3,8 p. 100

Dosage par colorimétrie : 154 mg/l.

La concordance entre les résultats de l'analyse chromatographique et de l'analyse colorimétrique est beaucoup moins bonne dans le cas du Château-Châlon que dans le cas du Xérès. Ceci s'explique par le fait que, la teneur en acétaldéhyde étant beaucoup plus faible, une quantité plus importante de vin a été distillée pour le dosage colorimétrique : 2 ml dans le cas du Château-Châlon, seulement 0,5 ml dans le cas du Xérès. Or, des essais nous ont montré que la réaction colorimétrique était gênée par la présence d'alcool. La méthode par oximation nous semble donc préférable dans le cas des boissons alcooliques.

Remarquons enfin que, comme les résultats obtenus par la méthode colorimétrique, dans le cas de la distillation du vin sans neutralisation, les résultats obtenus par oximation correspondent à la somme : acétaldéhyde + acétal, l'acétal étant hydrolysé par le chlorhydrate d'hydroxylamine.

III. — DISCUSSION

1° Il est bien connu que le chlorhydrate d'hydroxylamine réagit non seulement avec les composés carbonylés, les acétals et les lactones, mais avec de nombreux autres corps, en particulier avec les esters, avec lesquels il donne des acides hydroxamiques. Mais cette réaction ne se fait pas en milieu aqueux ; nous avons vérifié que les esters ne subissent effectivement aucune transformation sous l'action du chlorhydrate d'hydroxylamine dans nos conditions d'expérience. Les autres corps susceptibles de réagir n'existent pas dans les vins (amides volatiles, éthers vinyliques).

2° D'autre part, l'emploi d'une phase séparant mieux les produits de poids moléculaire relativement faible aurait peut-être permis une meilleure séparation de pics d'oximes se trouvant en faible quantité, des pics correspondant à des produits existant en quantité plus importante. Malheureusement, en utilisant dans ce but une colonne de Carbowax 1540, les aldéhydes donnent non pas un pic unique, comme sur la colonne de DEGS, mais un pic à 2 ou parfois 3 sommets peut-être dus à la présence

des formes α et β, la température relativement faible de la chromatographie rendant peu probable la décomposition de l'oxime en nitrile. Ceci rend alors impossible l'emploi de la méthode des étalons internes, qui nous a permis de nous assurer de l'identité des pics.

3° Enfin, il faut remarquer que le pic d'oxime de l'hexanal est très voisin du pic de butylène glycol (correspondant également au caprate d'éthyle), et pourrait s'y superposer. Mais l'extraction par l'éther de certaines substances, en particulier des lactates d'éthyle et d'isoamyle et du butylène glycol, étant incomplète, donc irrégulière, nous n'avons pas pu attribuer à la présence d'hexanal l'augmentation souvent observée de la hauteur de ce pic après oximation.

CONCLUSION

La méthode d'oximation présente donc beaucoup d'avantages pour l'étude des aldéhydes du vin. Elle évite les pertes toujours à craindre par distillation ; elle s'est montrée rapide et précise, et présente une grande spécificité.

Reçu pour publication en janvier 1966.

SUMMARY

IDENTIFICATION OF CARBONYL COMPOUNDS AND DETERMINATION OF ACETALDEHYDE IN SOME WINES BY GAS CHROMATOGRAPHY

Oximes of aldehydes and ketones of the aliphatic series are obtained by direct treatment of the wine with hydroxylamine, followed by ether extraction ; these oximes are submitted to gas chromatography, which allows carbonyl compounds to be identified easily. Acetaldehyde can be evaluated thanks to this method.

Oxination has also been used as a differential method to identify some other compounds containing an aldehydic or ketonic group, as well as lactones.

No aliphatic aldehyde other than acetaldehyde was found in the wines which have been examined, but it was possible to find furfural, acetoin, and γ-butyrolactone on the chromatograms.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BASSETTE R., OZERIS S., WHITNAH C. H., 1963. Direct chromatographic analysis of milk. *J. Food Sci.*, **28**, 84-90.

BAYER E., 1957. Aromastoffe des Weines. II. Aliphatische Aldehyde des Weines und der Trauben. *Vitis*, **1**, 93-95.

CASON J., HARRIS E. R., 1959. Utilization of gas phase chromatography for identification of volatile products from alkaline degradation of herqueinone. *J. Org. Chem.*, **24**, 676-679.

FROMAGEOT C., HEITZ P., 1938. Méthode de dosage spécifique de l'alanine et de la somme sérine+acide aspartique. *Microchim. Acta*, **3**, 52-67.

LOHR L. J., WARREN R. W., 1962. Gas chromatography of certain oximes. *J. Chromatogr.*, **8**, 127-129.

MECKE R., SCHINDLER R., DE VRIES M., 1960. Gaschrgraphomatoische Untersuchungen an Weinen. *Wein Wiss.*, **15**, 183-191.

RALLS J. W., 1960. Rapid method for semiquantitative determination of volatile aldehydes, ketones and acids. Flash exchange chromatography. *Anal. Chem.*, **32**, 332-336.

RODOPOULO A. K., EGOROV I. A., 1965. Les composés carbonylés du Xérès. *Vinodelie i Vinograd*, **25** (1), 6-9.

SOUKUP R. J., SCARPELLINO R. J., DANIELCZIK E., 1964. Gas chromatographic separation of 2,4-dinitrophenylhydrazone derivatives of carbonyl compounds. *Anal. Chem.*, **36**, 2255-2256.

STANLEY W. L., IKEDA R. M., VANNIER S. H., ROLLE L. A., 1961. Determination of the relative concentration of the major aldehydes in lemon orange and grapefruit oils by gas chromatography. *J. Food Sci.*, **26**, 43-48.

WEBB A. D., KEPNER R. E., 1962. The aroma of flor sherry. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **13** (1), 1-14.

WEBB A. D., RIBÉREAU-GAYON P., BOIDRON J. N., 1964. Composition d'une essence extraite d'un vin de *V. vinifera* (variété Cabernet-Sauvignon). *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1415-1420.

Ann. Technol. agric., 1966, **15** (2), 173-180.

RECHERCHES SUR LES BACTÉRIES LACTIQUES DES VINS

I. — Isolement et classification

P. BARRE

avec la collaboration technique de Marie-José Amouroux et A. Di Noto

Station de Technologie agricole,
Centre de Recherches agronomiques du Midi, 34 - Montpellier

SOMMAIRE

Cinquante-huit souches de bactéries lactiques ont été isolées des vins languedociens, 3 semaines après la fin des vendanges. Elles se répartissent de la manière suivante : 9 lactobacilles homofermentatifs, 16 lactobacilles et 33 coques hétérofermentatifs, représentant 6 espèces différentes dont l'une non identifiée. Toutes ces souches attaquent l'acide malique, 42 l'acide citrique et 2 l'acide tartrique. L'étude taxonomique de ces bactéries m'a amené à établir le rapport $\frac{\text{éthanol}}{\text{acide lactique}}$, beaucoup plus constant et beaucoup plus caractéristique que le rapport $\frac{\text{acide acétique}}{\text{acide lactique}}$, comme critère d'homo- ou d'hétérofermentativité.

I. — INTRODUCTION

L'intervention des bactéries lactiques dans l'élaboration et la conservation des vins est reconnue depuis les études de Pasteur. La fermentation malolactique, la tourne (dégradation biologique de l'acide tartrique), différents types de fermentation des glucides (piqûre lactique, fermentation mannitique) et du glycérol sont provoqués par le métabolisme de ces micro-organismes. Enfin des manifestations diverses telles que l'apparition d'acétoïne et de diacétyle, la modification de la couleur, le comportement des vins lors de leur maturation, sont sous la dépendance plus ou moins grande des bactéries lactiques.

Une étude systématique portant sur 3 000 échantillons prélevés dans toute la région Hérault-Gard, 3 semaines après les vendanges 1964, a été entreprise pour déterminer la fréquence de la prolifération des bactéries lactiques, mise en évidence par chromatographie sur papier (disparition de l'acide malique et apparition d'acide

lactique) et par examen microscopique. 35 p. 100 des examens se sont révélés positifs : cela situe bien l'intérêt de ces micro-organismes sur le plan œnologique. De plus, on peut s'attendre à ce que le vin, milieu naturel très particulier et qui se situe à la limite des possibilités de vie des bactéries lactiques, renferme un matériel biologique particulièrement adapté à l'étude de problèmes biochimiques tels que l'apparition d'acide acétique dans la fermentation hétérolactique et le métabolisme des acides organiques y compris l'acide tartrique.

L'objet de cette première partie est donc d'isoler et de classer les bactéries lactiques des vins du Languedoc.

II. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

A — *Isolement et purification*

1° Le vin contaminé est soumis à des dilutions successives en milieu liquide E : *yeast extract* Difco : 6 g, bactotryptone Difco : 2 g, jus de tomate : 60 ml, acide DL-malique : 10 g, glucose : 15 g, Mg, Mn, Fe, Ca : traces, eau 1 000 ml, pH 4,2, stérilisation : 35 minutes à 110°C. Quelques grains de mycostatine sont ajoutés avant l'ensemencement, puis les tubes sont placés sous pyrogallate.

2° La culture ainsi obtenue est purifiée par dilutions successives ensemencées dans la masse en milieu E gélosé à 1 p. 100. On subclone à partir d'une colonie bien isolée. Il a été souvent nécessaire d'ajouter 2 g/l d'acide ascorbique pour obtenir une bonne reproduction des dilutions et une répartition convenable des colonies sur toute la profondeur de la gélose.

B — *Étude et détermination*

Le mode de classification utilisé est celui de BERGEY (1957). Les tests d'identification sont ceux décrits par la *Society of American Bacteriologists* (1957), avec des modifications dues soit aux grandes exigences nutritives des germes étudiés, soit aux besoins particuliers de la classification dans les groupes envisagés.

Le milieu de base est le milieu I : *yeast extract* Difco : 6 g, bactotryptone Difco : 2 g, Mg, Mn, Fe, Ca : traces, solution vitaminique complexe (1) : 2 ml, eau : 1 l.

1° Températures optimales et maximales : les croissances aux températures de 25, 30, 35, et 42°C sont mesurées par l'évolution turbidimétrique du milieu E.

2° Action de l'oxygène : elle est observée par comparaison turbidimétrique entre une culture en milieu liquide placée sous pyrogallate et une culture en contact avec l'air, et par la répartition des colonies suivant la hauteur dans une culture en gélose profonde. Tous les germes nettement sensibles à l'oxygène ont été cultivés sous pyrogallate (tubes 18 × 18) ou sous azote selon la technique de MURPHY et SALETAN (1963).

3° Catalase : en milieu I + 10 g/l glucose, gélosé à 1 p. 100. On prélève une colonie que l'on place sur une lame en contact avec 3 gouttes de H_2O_2 10 volumes, afin d'observer un éventuel dégagement de bulles d'oxygène.

4° Acétylméthylcarbinol : en milieu I + 10 g/l de glucose pH 4,8. La présence d'acétoïne, après 8 jours d'incubation, est caractérisée par réaction à la créatine — α-naphtol en milieu basique.

5° Formation de nitrites à partir des nitrates : en milieu I + 1 g/l de glucose + 1 g/l de NO_3K les nitrites sont recherchés par la réaction à l'acide sulfanilique — α-naphtylamine.

6° Nature optique de l'acide lactique : selon BARRE (1966).

7° Caractère homo- ou hétérofermentatif.

a) Mise en évidence d'un dégagement gazeux par la technique de GUERRA (1958). C'est toutefois un procédé approximatif étant donné la croissance souvent faible des germes étudiés sur des milieux ne devant contenir aucun substrat capable de libérer du CO_2 (acides organiques par exemple) autre que le glucose.

(1) Biotine : 0,3 mg, acide folique : 5 mg, acide nicotinique : 100 mg, pyridoxine : 300 mg, P.A.B. : 50 mg, thiamine : 100 mg, panthoténate de Ca : 50 mg pour 1 litre de solution.

b) Établissement du rapport $\frac{\text{acide acétique}}{\text{acide lactique}}$: CARR (1957) propose de classer comme hétérofermentatives les souches pour lesquelles ce rapport est supérieur à 0,1. J'ai trouvé cette donnée très variable pour un même micro-organisme avec les conditions dans lesquelles se déroulent le test : milieu, durée d'incubation et surtout pH. Certaines bactéries étudiées donnent des rapports variant entre 0,08 et 0,5 selon ces conditions. J'ai obtenu, pour l'ensemble des souches considérées, toute une gamme de valeurs du rapport de CARR se plaçant de façon continue entre 0,04 et 0,5. De nombreux germes donnent un résultat voisin de 0,1 : il serait illogique de les classer dans l'un des deux groupes ou bien dans un 3e groupe intermédiaire. La description par DUPLESSIS et VAN ZYL (1963 *a*) d'un lactobacille hétérofermentatif dont le rapport de CARR est, dans les conditions expérimentales utilisées par les auteurs, de 0,05 confirme ces résultats.

c) Établissement du rapport $\frac{\text{mmol éthanol}}{\text{mmol acide lactique}}$: le schéma principal de la fermentation hétérolactique a été mis en évidence par DE MOSS, BARD et GUNSALUS (1951) : il établit une relation entre l'acide lactique et l'éthanol :

$$1 \text{ glucose} \rightarrow 1 \text{ ac. lactique} + 1 \text{ éthanol} + 1 \text{ } CO_2$$

la libération d'acide acétique se fait indépendamment de la production du lactate par une voie métabolique séparée qui provoque vraisemblablement la production de glycérol et de CO_2. Dans ces conditions le rapport $\frac{\text{éthanol}}{\text{acide lactique}}$ est théoriquement égal à 1 pour les bactéries hétérofermentatives alors qu'il est voisin de 0 pour les germes homofermentatifs. C'est la raison pour laquelle j'ai établi ce rapport pour toutes les souches étudiées.

En fait sa valeur reste constante avec les conditions de fermentation et permet de diviser sans ambiguïté les bactéries isolées en 2 groupes distincts :

— bactéries donnant un rapport compris entre 0,8 et 1,05. Elles présentent un test de GUERRA faiblement à fortement positif et produisent du mannitol à partir du lévulose : ce sont les souches hétérofermentatives.

— bactéries donnant un rapport inférieur à 0,05. Elles présentent un test de GUERRA négatif, ne donnent pas du mannitol à partir du lévulose et ont un rapport de CARR inférieur à 0,12 : ce sont les souches homofermentatives.

8° Fermentescibilité des glucides et des polyols : les précultures sont faites sur milieu I + 5 g/l de glucose + 1 g/l d'acide ascorbique + 5 g/l du composé testé. L'essai est conduit sur le même milieu sans glucose à pH 5,2 en prenant la précaution d'introduire le substrat carboné par filtration stérilisante. Après 21 jours d'incubation à 25°C on compare le pH avec celui d'une culture faite dans les mêmes conditions sur milieu sans substrat carboné. Un écart supérieur à 0,4 unité est considéré comme une réponse faiblement positive, un écart supérieur à 1 unité est considéré comme une réponse positive.

9° Fermentescibilité des acides organiques : l'assimilation des acides organiques est, généralement, un phénomène d'assez faible amplitude chez les bactéries lactiques. Par contre leur métabolisation est très fréquente. Aussi avons-nous testé l'attaque de ces composés à l'aide de cellules non proliférantes recueillies par centrifugation stérile à partir d'une culture sur milieu E + 10 g/l du substrat considéré. Les bactéries lavées à l'eau distillée sont remises en suspension dans un tube contenant 10 ml de milieu I pH 4,2 + 5 g/l d'acide testé. L'apparition et la disparition éventuelles des acides fixes sont recherchées par chromatographie sur papier après clarification et décationisation des milieux de culture.

C — *Méthodes analytiques*

Elles sont décrites dans des travaux précédents : BARRE et GALZY (1962), BARRE (1966).

III. — RÉSULTATS

Les souches isolées sont Gram +, asporulées, microaérophiles à anaérobies facultatives, non pigmentées, catalase — ; elles ne réduisent pas les nitrates et présentent une croissance faible à nulle en surface. Elles se présentent sous forme de bâtonnets ou de coques. Les glucides sont indispensables à un bon développement cellulaire, leurs métabolismes conduisent à l'acide lactique ainsi que, facultativement, à l'acide acétique, à l'éthanol, au glycérol et au CO_2. Les températures optimales ne sont jamais supérieures à 35°C.

TABLEAU I

Principales caractéristiques des souches bactériennes isolées des vins languedociens

Genres	Types	Action de l'oxygène	Acétyl-méthyl Carbinol	Homo ou Hétéro-ferment	Nature optique ac. lactique	Glucides et polyols fermentés												Acides fermentés		
						Arabinose	Xylose	Rhamnose	Mannose	Galactose	Saccharose	Maltose	Lactose	Raffinose	Mannitol	Sorbitol	Glycérol	Ac. malique	Ac. citrique	Ac. tartrique
Lactobacillus	I 4 souches	—	+	homo	DL	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	×	+	+	O
	II 5 souches	—	+	homo	L (+) à DL + L	—	+	*x*	+	+	+	+	×	*x*	+	+	—	+	+	—
	III 8 souches	—	—	hétéro	DL	—	+	—	—	+	+	+	—	V	—	—	—	+	—	—
	IV 4 souches	—	—	hétéro	DL + D	—	+	—	—	+	+	+	—	V	—	—	—	+	—	—
	V 1 souche	—	—	hétéro	DL	+	+	—	+	+	+	+	×	+	+	+	×	+	—	—
	VI 2 souches	—	—	hétéro	DL + D	+	+	—	—	+	+	+	×	+	+	—	—	+	—	—
	VII 1 souche	—	—	hétéro	D (—)	+	+	—	—	+	—	+	—	+	×	—	—	+	+	+
Leuconostoc	I 6 souches	+	—	hétéro	D (—)	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—
	II 7 souches	+	—	hétéro	D (—)	+	—	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	+	+	—
	III 3 souches	+	—	hétéro	D (—)	—	—	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	+	+	—
	IV 16 souches	+	—	hétéro	D (—)	+	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—

Glucose et lévulose sont toujours fermentés. — : pas d'attaque. × : attaque faible. + : attaque positive. *x* faiblement positif à négatif suivant les souches. O : positif ou négatif. V : faiblement à fortement positif.

DL : acide lactique racémique. DL + D : composé D dominant. DL + L : composé L dominant. Action de l'oxygène : + : sensible. — : insensible.

Les résultats relatifs à l'action de l'oxygène, à la production d'acétylméthylcarbinol, au caractère homo ou hétéro- fermentatif, à la nature optique de l'acide lactique et à l'attaque des substrats essayés sont portés dans le tableau 1.

IV. — DISCUSSION

Les souches isolées se classent dans la famille des *Lactobacillaceae* WINSLOW et *al.*, et se répartissent entre les genres *Lactobacillus* BEIJERINCK et *Leuconostoc* VAN TIEGHEM. Onze types différents ont été distingués.

1° *Genre* Lactobacillus

A — *Souches homofermentatives*

— Le type 1 est assimilable à *Lactobacillus plantarum* (ORLA-JENSEN) HOLLAND, malgré la non fermentation du xylose : la nature optique de l'acide lactique produit (racémique) en premier lieu, et la fermentation vigoureuse de l'arabinose constituent des points d'identification très sûrs. Une souche fermente, quoique lentement, l'acide tartrique. Ce caractère, qui possède une importance taxonomique dans le genre *Clostridium* (voir DUPUY, 1960), n'a pas été encore pris en considération dans le genre étudié. Des souches de *Lactobacillus plantarum* dégradant l'acide tartrique ont déjà été isolées à partir de vins californiens : (BERRY et VAUGHN, 1952).

— Le type II est identifié à *Lactobacillus casei* (ORLA-JENSEN) HOLLAND, car il produit de l'acide lactique L (+) seul ou avec de faibles quantités d'acide D (—). La faible attaque du lactose le différencie de l'espèce décrite, mais ce fait a déjà été constaté sur des souches de *Lactobacillus casei* non isolées de produits laitiers (ROGOSA et *al.*, 1953.) Cette espèce est particulièrement intéressante à signaler, car c'est la première fois qu'elle est identifiée de façon formelle dans des vins, probablement à cause de la difficulté de la réalisation du test sur la nature optique de l'acide lactique. La troisième espèce de lactobacille homofermentatif non thermophile *Lactobacillus leichmanii* BERGEY et *al.* a été trouvée par DUPLESSIS et VAN ZYL (1963 *b*) dans les vins d'Afrique du Sud.

Les lactobacilles homofermentatifs présentent une croissance très vigoureuse. De tous les germes étudiés, ce sont ceux qui abaissent le plus le pH des milieux glucosés. La production d'acétoïne à partir du glucose semble être une caractéristique de leur métabolisme.

B — *Souches hétérofermentatives.*

— Le type III est identique à une espèce décrite sous le nom de *Lactobacillus hilgardii* par DOUGLAS et CRUESS (1936) et par VAUGHN, DOUGLAS et FORNACHON (1949). Cette espèce quoique citée dans la 6e édition du *Bergey's manual of determinative bacteriology*, ne figure pas dans le cadre de la 7e édition.

— Le type IV ne diffère du précédent que par la nature optique de l'acide lactique produit à partir du glucose : DL + D au lieu de DL (de 22 à 35 p. 100 d'acide L (+)). Ce caractère n'étant pas encore utilisé dans la classification des lactobacilles hétérofermentatifs, on peut considérer ce groupe comme formant une variété de *Lactobacillus hilgardii.*

— Le type V n'est constitué que d'une seule souche que l'on peut identifier à *Lactobacillus buchneri* BERGEY et *al.* Elle fermente vigoureusement raffinose, saccharose et mannose ; de plus sa température optimale est voisine de 35°C et elle présente une croissance encore appréciable à 42°C.

— Le type VI diffère du précédent par la non fermentation du mannose et la nature optique de l'acide lactique (DL + D). Il peut être considéré comme une variété de *Lactobacillus buchneri* en regard de ses relations de température et de la vigoureuse fermentation du raffinose et du saccharose (1).

— Le type VII est constitué par une souche qui diffère totalement des espèces décrites par la nature optique de l'acide lactique : D (—), avec absence totale d'acide L (+). Les glucides fermentés et les relations de température la rapprochent de *Lactobacillus brevis* BERGEY et *al.* Elle s'en distingue nettement par l'attaque vigoureuse du raffinose. Cette souche dégrade très rapidement l'acide tartrique. L'ensemble de ces remarques la sépare nettement des espèces décrites.

2° *Genre* Leuconostoc

Ce genre groupe les coques hétérofermentatifs : ils donnent de l'acide lactique D (—). Les souches étudiées se caractérisent par leur sensibilité à l'oxygène (croissance fortement ralentie), et le nombre restreint de glucides qu'elles sont capables d'assimiler et de fermenter. Les souches qui fermentent le saccharose, ne produisent pas de dextranes à partir de ce substrat. Ces caractères se retrouvent chez des coques isolés de vins champenois BARRE (1962) (non publié), et chez des souches décrites par BIDAN (1956). Par contre, les germes isolés par PEYNAUD (1963) et FORNACHON (1964) sont tout à fait différents. Seule des espèces décrites, *Leuconostoc citrovorum* HUCKER et PEDERSON, ne fermente qu'un nombre aussi restreint de glucides : parmi ceux-ci figurent lactose et galactose qui ne sont pas utilisés par nos souches : cela ne constitue pas une différence très nette lorsque l'on pense que l'espèce a été décrite à partir de germes isolés de produits laitiers. La vigoureuse fermentation de l'acide citrique constitue un point de ressemblance supplémentaire.

Le groupe VIII s'apparente donc sans aucun doute à cette espèce. Le groupe XI et même les groupes IX et X, bien qu'ils fermentent le saccharose, en constituent des variétés dont l'habitat est très différent de celui des types qui ont servi à la description de l'espèce.

Les résultats de cette discussion sont résumés dans le tableau 2.

Ce travail a permis de constater la prédominance des germes hétérofermentatifs dont la nature du métabolisme est facilement mise en évidence par l'établissement du rapport $\frac{\text{éthanol}}{\text{acide lactique}}$. Cette prédominance a été constatée dans les régions vinicoles où une recherche similaire a été effectuée, sauf en Uruguay (POITTEVIN, CARRASCO et GIOIA) (1963).

(1) ROGOSA et *al.* (1953 et 1959) donnent comme caractéristique principale de *Lactobacillus buchneri* la fermentation du mélécitose. PEDERSON ne se sert pas de ce critère dans la 7e édition du ***Bergey's*** mais insiste surtout sur la fermentation du raffinose et les températures optimales et maximales de croissance. De plus DUPLESSIS et VAN ZYL (1963 *b*) ont décrit 4 souches hétérofermentatives fermentant le mélécitose et qui ne sont cependant pas assimilables à *Lactobacillus buchneri*. Il semble donc que la fermentation de ce composé ne puisse être encore utilisée comme critère déterminant de cette espèce.

L'identification de plusieurs souches de *Lactobacillus casei* venant après celle de toutes les espèces déjà reconnues, montre la grande variété de l'ensemencement des vins en bactéries lactiques. Le grand nombre des isolements de *Leuconostoc citrovorum* est également un point remarquable.

TABLEAU 2

Espèces bactériennes isoléees des vins languedociens

Espèces	Nombre de souches
I. — Espèces homofermentatives	
Lactobacillus plantarum	4
Lactobacillus casei	5
II. — Espèces hétérofermentatives	
Lactobacillus hilgardii	12
Lactabocillus species	1
Lactobacillus buchneri.....	3
Leuconostoc citrovorum.	33

Enfin l'existence, quoique en faible proportion, de souches capables de fermenter l'acide tartrique, montre l'intérêt technologique qui s'attache à la dégradation de ce composé par les lactobacilles.

Reçu pour publication en mars 1966.

SUMMARY

RESEARCH ON LACTIC ACID BACTERIA OF WINES

I. — ISOLATION AND CLASSIFICATION

This work describes 58 strains of lactic acid bacteria isolated from wines. The author proposes the use of the ethanol/lactic acid ratio as a criterion of homo- or heterofermentativity.

The dominant species is *Leuconostoc citrovorum*. *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus buchneri*, and *Lactobacillus hilgardii* were also recognized. It was not possible to identify a heterofermentative lactobacillus giving D (—) lactic acid from glucose.

All the strains ferment malic acid ; 42 ferment citric acid and 2 tartaric acid.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BARRE P., GALZY P., 1962. Étude d'un lactobacille homofermentatif isolé du vin. *Ann. Technol. agric.*, **11**, 121-130.

BARRE P., 1966. Détermination rapide de la nature optique de l'acide lactique produit dans les fermentation, bactériennes. Ses applications dans la classification des *Lactobacillaceae* WINSLOW et *al.* sous presse.

BERRY J. M., VAUGHN R. H., 1952. Decomposition of tartrates by *Lactobacilli*. *Proc. amer. Soc. enol.*, 135-137, Davis, California.

BIDAN P., 1956. Sur quelques bactéries isolées de vins en fermentation malolactique. *Ann. Technol. agric.*, **5**, 597-617.

BREED R. S., MURRAY E. G. D., SMITH N. R., 1957. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 7th edition, The Williams and Wilkins company, Baltimore.

CARR J. G., 1957. Occurence and activity of some lactic acid bacteria from apple juices, ciders and perries. *J. Inst. Brew.*, **63**, 436-440.

DE MOSS A. D., BARD A. C., GUNSALUS I. C., 1951. The mecanism of heterolactic fermentation. A new route to ethanol formation. *J. Bacteriol.*, **62**, 499-511.

DOUGLAS H. C., CRUEESS W. V., 1936. A ***lactobacillus*** from california wine : *Lactobacillus hilgardii*. *Food Research*, **1**, 113-119.

DU PLESSIS L. de W., VAN ZYL J. A., 1963 *a*. The microbiology of south-african wine making. Part. VI-Fermentation of D-glucose, D-fructose, D-xylose and L-arabinose by lactic acid bacteria from dry wines. *S. Afr. J. agric. Sci.*, **6**, 673-687.

DU PLESSIS L. de W., VAN ZYL J. A., 1963 *b*. The microbiology of south-african wine making. Part. IV. The taxomony and incidence of lactic acid bacteria from dry wines. *S. Afr. J. agric. Sci.*, **6**, 261-273.

DUPUY P., 1960. Le métabolisme de l'acide tartrique. *Ann. Technol. agric.*, **9**, 139-184.

FORNACHON J. C. M., 1964. A ***leuconostoc*** causing malo-lactic fermentation in australian wines. *Amer. J. enol. Vit.*, **15**, 184-186.

LANGERON M., GUERRA M., 1938. Nouvelles recherches de zymologie médicale. *Ann. Parasitol*, **16**, 36-54.

MURPHY D. T., SALETAN L. T., 1963. Anaerobic plating of microorganisms. *Wallerstein Laboratories communications*, **26**, 181-182.

PEYNAUD E., DOMERCQ M^lle^ S., GUIMBERTEAU G., 1963. Travail de classification des bactéries lactiques des vins. *Ann. Technol. agric.*, **12**, n° hors-série, 1, 60-61.

POITTEVIN N. E., CARRASCO A., GIOIA M. N., 1963. Estudios sobre la fermentation malolactica en vinos del Uruguay. IV. Estudios de las bacterias lacticas en vinificaciones experimentales. *Rev. lat.-amer. Microbiol.*, **6**, 147-158.

ROGOSA M., WISEMAN F. F., MITCHELL J. B., DISRAELI M. N., 1953. Species differentiation of oral Lactobacilli from man including description of *Lactobacillus salivarius* n. sp. and *Lactobacillus cellobiosus* n. sp. *J. Bacteriol.*, **65**, 681-699.

ROGOSA M., SHARPE Y., 1959. An approach to the classification of Lactobacilli. *J. appl. Bacteriol.*, **22**, 329-340.

SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS, 1957. *Manual of microbiological methods*. Mc Graw Hill Book Company, New York.

VAUGHN R. H., DOUGLAS H. L., FORNACHON J. C. L., 1949. The taxonomy of *Lactobacillus hilgardii* and relative heterofermentative lactobacilli. *Hilgardia*, **19**, 133-139.

WOOD W. A., 1961. In GUNSALUS I. C., STANIER R. Y. *The bacteria*, vol. 2, 94-96, Academic Press, New York.

Ann. Technol. agric., 1966, **15** (2), 181-191.

ÉVOLUTION DE L'ACIDE ASCORBIQUE PENDANT LA FERMENTATION ALCOOLIQUE DU JUS DE RAISIN FRAIS ET DU JUS DE RAISIN DÉSULFITÉ ET LA CONSERVATION DES VINS CORRESPONDANTS

Andrée OURNAC

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 – Narbonne

SOMMAIRE

Les raisins frais renferment des doses de vitamine C non négligeables réparties entre le jus et les pellicules.

Les vins au contraire sont très pauvres en cette vitamine.

On a alors essayé de suivre l'évolution de cette vitamine au cours de la fermentation, puis au cours de la conservation du vin.

On a envisagé différents cas : jus de goutte frais, raisins foulés, jus sulfité-désulfité, jus ensemencés et jus vitaminés.

Enfin, l'addition de vitamine C aux vins, surtout aux vins blancs, en vue d'une meilleure conservation, étant autorisée, on a cherché à déterminer le comportement dans le temps de la vitamine C ajoutée à des vins finis

INTRODUCTION

Un certain nombre d'auteurs ont étudié ces problèmes, voici les résultats de leurs travaux :

— Lucie RANDOIN en 1928 a établi que le vin issu d'un moût défini renfermait beaucoup moins de vitamine C que ce mout.

— GUERASSIMOV et VINOGRADOVA (1931) dans un moût fermentant seul constatent que la vitamine C diminue pendant la durée de la fermentation.

En ce qui concerne les vins qui ont fermenté avec les pellicules et les rafles, la proportion de vitamine y augmente pendant toute la durée de la fermentation.

De nombreuses analyses sur des vins de table et des vins de liqueur d'âge différent, leur ont montré que les vins contiennent en général moins de vitamine C que les moûts et que les vins qui en contiennent le plus sont ceux qui ont été obtenus par macération et un contact plus ou moins prolongé du moût avec le marc.

— VENEZIA (1938) constate que la vitamine C en cours de fermentation passe en partie de la pellicule dans le vin où elle se maintient presque intégralement pendant trois mois.

— Lodi (1943) observe une diminution de l'acide ascorbique de 134 mg par kg de raisin à 3,6 mg par litre de vin ; il pense que cela est dû à une oxydation enzymatique.

— Enfin, Genevois et Ribéreau-Gayon (1947) signalent que le vin contient toujours une quantité de vitamine C de l'ordre de quelques milligrammes par litre, et que cette quantité peut même s'élever jusqu'à 10 à 15 mg par litre.

Il résulte de ces travaux que les jus de raisin frais renferment des teneurs non négligeables de vitamine C, différentes selon les auteurs, alors que les vins, d'une façon générale, en contiennent des quantités beaucoup plus faibles, presque négligeables.

Nous-même avons trouvé (Ournac, 1965) pour les jus de raisin frais des doses allant de 30 à 60 mg/l et pour les vins âgés d'un an au moins des doses variant entre 3 et 10 mg/l.

Il était alors intéressant d'étudier cette diminution de vitamine C du jus au vin, de déterminer le moment où elle se produit : au cours de la fermentation ou au cours de la conservation et les conditions pouvant influer sur cette diminution.

Enfin, à notre connaissance, aucun auteur n'avait étudié cette variation dans les jus désulfités.

TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE

Les essais de fermentation comportaient deux séries distinctes :

— Une série était réalisée à partir de jus de goutte frais et à partir de vendange entière éraflée, pour déterminer l'influence des pellicules du raisin qui sont riches en vitamine C ;

— une autre série était réalisée à partir de jus de raisin sulfités au moment de leur élaboration et désulfités avant leur mise en fermentation.

Pour déterminer l'action possible des levures sur la vitamine C, notre étude a porté parallèlement sur des jus ensemencés massivement avant le départ en fermentation à raison de 50 millions de cellules au ml.

Enfin pour comparer le comportement de la vitamine naturelle du jus à celui de la vitamine exogène, certains jus étaient enrichis en acide ascorbique à la dose de 50 mg/l.

L'acide ascorbique était dosé tous les jours au cours de la fermentation que l'on a considérée comme terminée au bout de 10 jours, puis à intervalles plus espacés pendant la conservation des vins.

Le dosage était réalisé par précipitation à la dinitrophénylhydrazine après défécation mercurique qui élimine certains corps interférants (Ournac, 1965). On obtient ainsi la vitamine totale : forme réduite + forme oxydée. Dans ces conditions, les variations de vitamine pouvant être constatées ne seront pas dues à une oxydation, mais seront dues à une disparition.

Pour l'étude de la vitamine ajoutée au vin on a considéré des vins âgés de 6 mois environ, dont la teneur en vitamine C est faible et à peu près stabilisée, on les a additionnés d'acide ascorbique pur aux doses de 50 et 100 mg par litre.

La teneur de ces vins en vitamine C a été déterminée à intervalles réguliers pendant un an.

I. — RÉSULTATS POUR LES JUS FRAIS ET LA VENDANGE ENTIÈRE

Les résultats des dosages sont représentés par le tableau 1 et les figures 1 à 6.

1° *Pendant la fermentation*

Pour les jus de goutte. — La vitamine diminue continuellement dans tous les essais.

La vitesse de disparition de la vitamine est la même dans les jus levurés et dans

les jus non levurés ; elle reste sensiblement constante pendant toute la durée de la fermentation, elle varie de 1 à 5 mg par jour pour 1 litre.

Dans les jus enrichis, la vitamine C disparaît avec une vitesse nettement supérieure à celle observée pour les jus naturels, surtout au début de la fermentation. Elle est comprise entre 1 et 10 mg par jour pour un litre de jus, levuré ou non.

TABLEAU I

Jus et raisin frais

Vitamine C totale en mg/l, pendant la fermentation, puis pendant la conservation du vin

Cépage		Jus avant fermentation	Vin après 10 jours de fermentation	Vin après 6 mois de conservation	Vin après 1 an 6 mois de conservation
Aramon	Jus de goutte	51	24,5	5	3
	Jus de goutte + vitamine ..	98	49,5	8	5,8
	Vendange entière.....	48,5	30	6,6	6
Carignan blanc	Jus de goutte	49,7	30	5,5	4,6
	Jus de goutte + vitamine ..	97	60	8	6,6
	Vendange entière.....	38	32	9	4,6
Carignan rouge	Jus de goutte	44	21,7	4,8	4,5
	Jus de goutte + vitamine ..	90	42,5	9,3	5,3
	Vendange entière.....	48	32,5	7,3	7
Hybride blanc n° 12375	Jus de goutte	57	32	5,3	3,3
	Jus de goutte + vitamine ..	105	59,5	7	7
	Vendange entière.....	60	42,5	8	6,6
Valdiguié	Jus de goutte	36	20	3,3	2,7
	Jus de goutte + vitamine ..	87,5	45	7	3,4
	Vendange entière.....	32	21	5,5	2,7
Morastel	Jus de goutte	33	18,5		2 7
	Jus de goutte + vitamine ..	79,5	44,5		4,8
	Vendange entière.....	30	24		2,7

La vitesse de disparition de la vitamine C serait proportionnelle à la teneur de vitamine présente dans le milieu et pratiquement indépendante du nombre de levures présentes dans le milieu.

La quantité de vitamine disparue au cours de la fermentation que nous avons considérée d'une durée de 10 jours dans les quatre cas envisagés, avec et sans addition de levures et d'acide ascorbique, est comprise entre 40 et 50 p. 100 de la vitamine initiale.

La vitamine ajoutée se comporte comme la vitamine naturelle, elle disparaît aussi à raison de 20 à 50 p. 100.

On peut donc dire qu'à la fin de la fermentation, on ne retrouve plus dans les vins de goutte que la moitié de la vitamine C présente dans le jus d'origine.

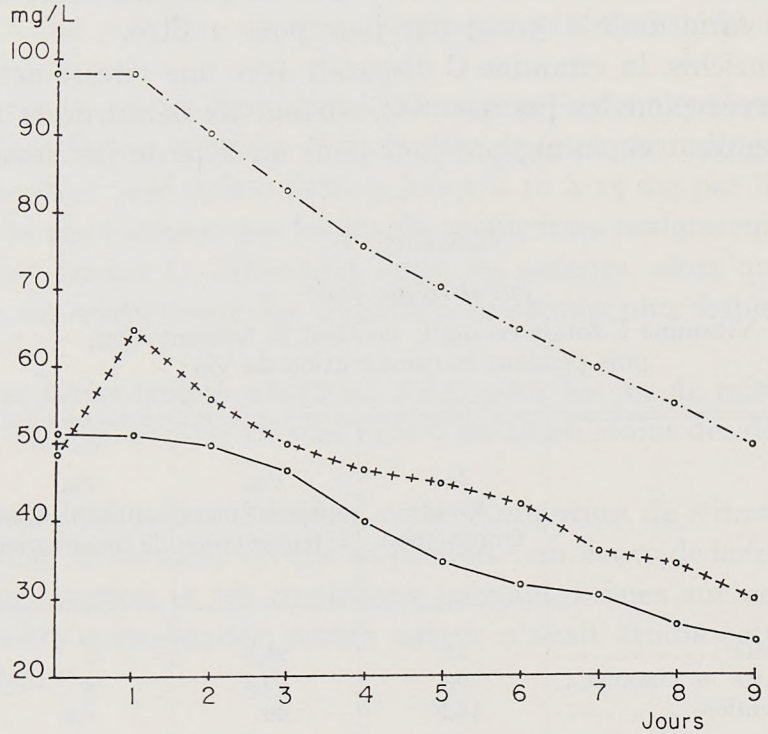


FIG. 1. — *Aramon*
Vitamine C en mg/l pendant la fermentation

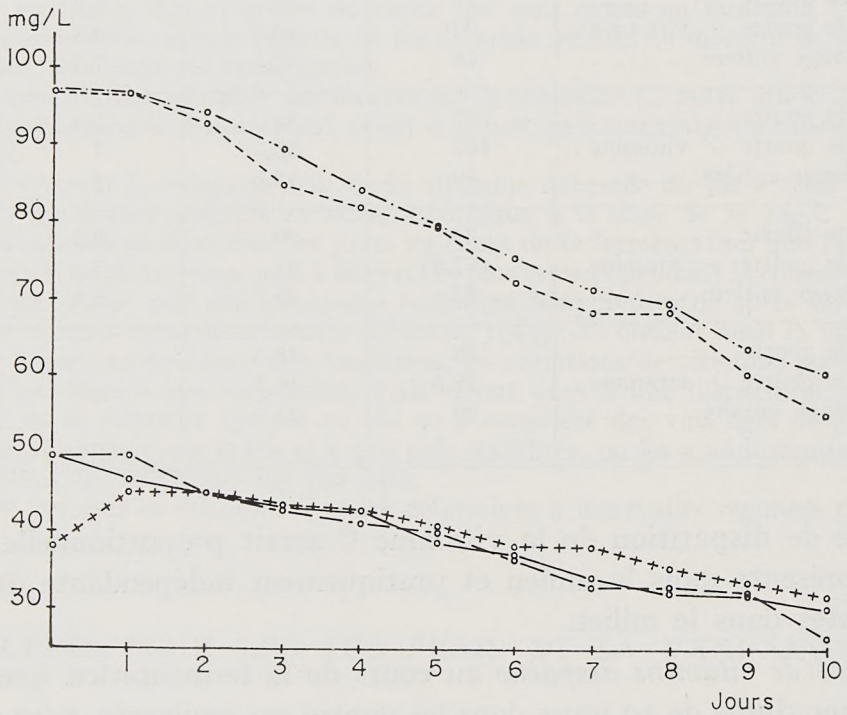


FIG. 2. — *Carignan blanc*
Vitamine C en mg/l pendant la fermentation

——— Jus.
— — — Jus + levures.
—·—·— Jus + vitamine C.
------ Jus + vitamine C + levures.
++++ Jus de macération.

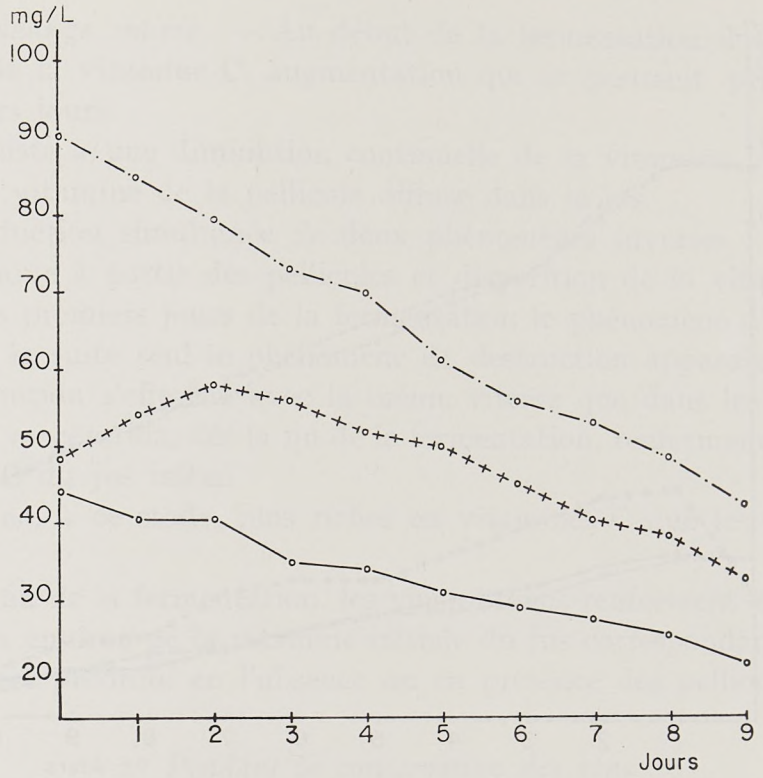


FIG. 3. — *Carignan rouge*
Vitamine C en mg/l pendant la fermentation

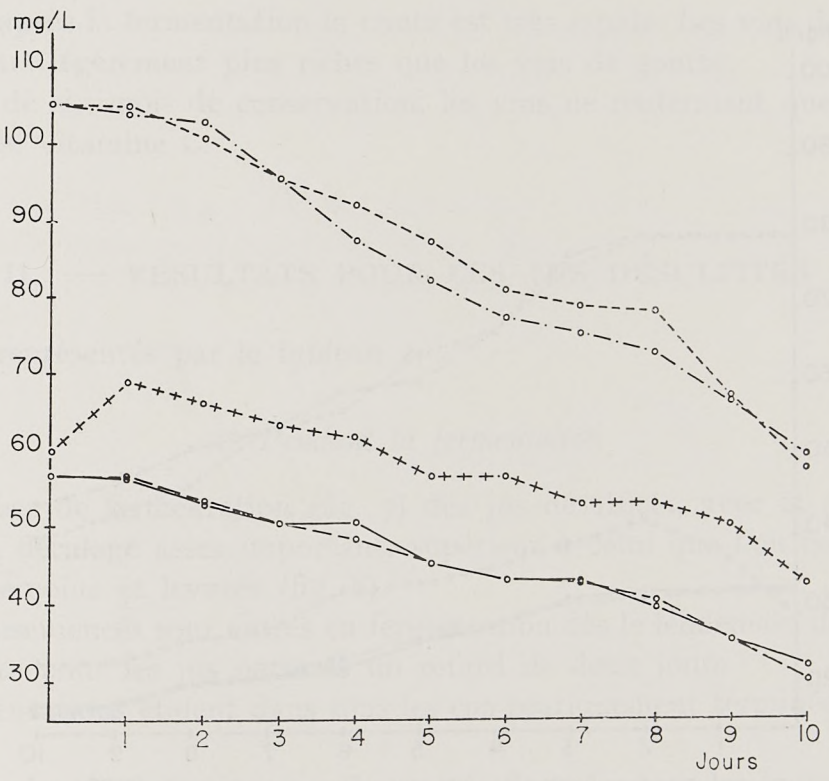


FIG. 4. — *Hybride blanc n° 12 375.*
Vitamine C en mg/l pendant la fermentation

——— Jus.
— — — Jus + levures.
—.—.— Jus + vitamine C.
– – – – – Jus + vitamine C + levures.
++++ Jus de macération.

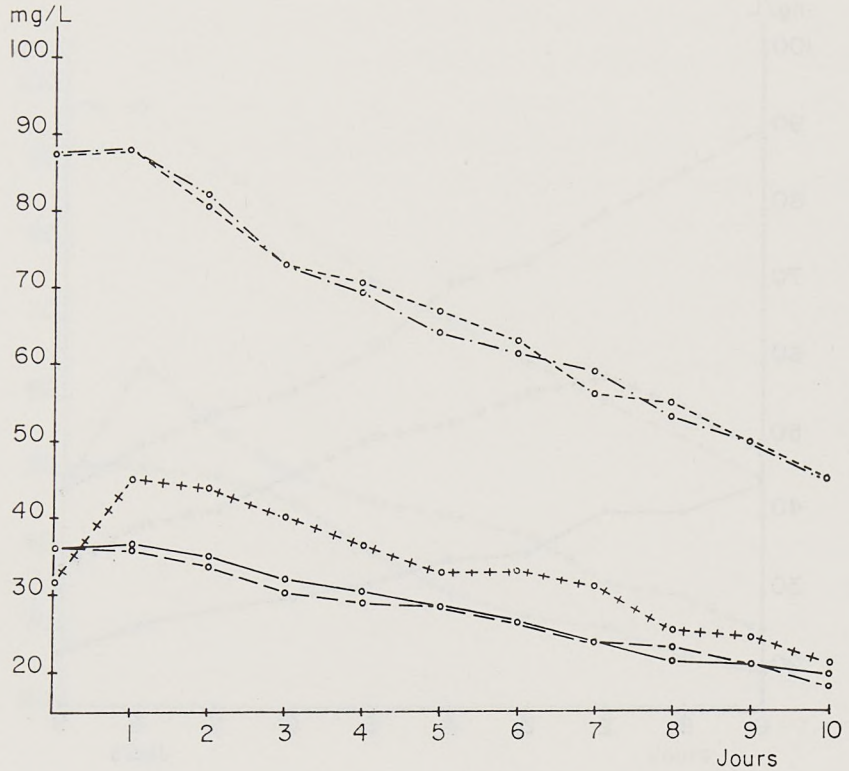


FIG. 5. — *Valdiguié*
Vitamine C en mg/l pendant la fermentation

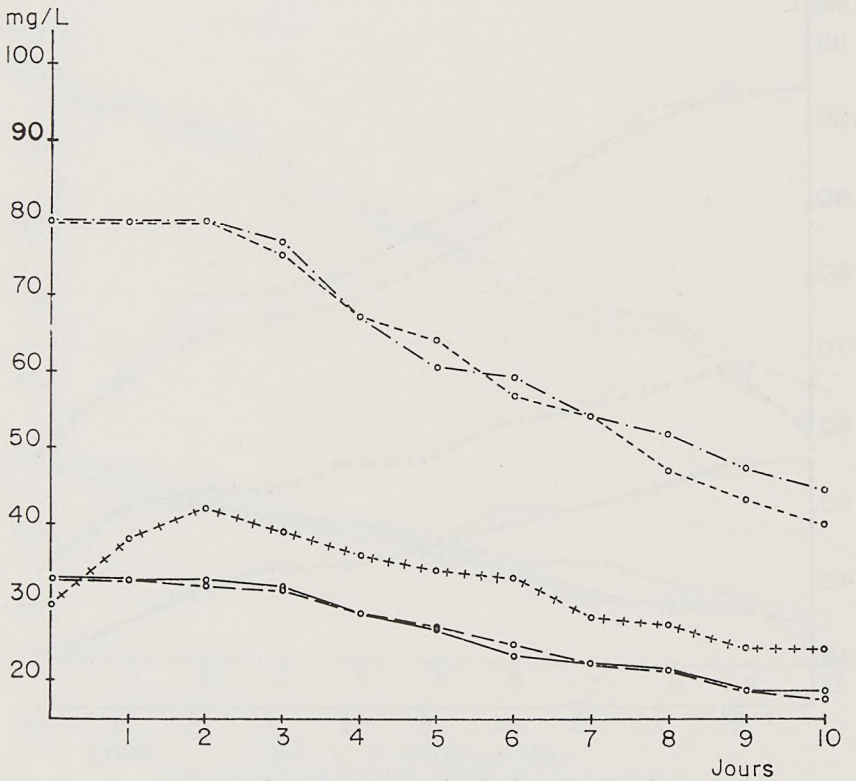


FIG. 6. — *Morastel*
Vitamine C en mg/l pendant la fermentation

——— Jus.
— — — Jus + levures.
—·—·— Jus + vitamine C.
- - - - - - Jus + vitamine C + levures.
++++ Jus de macération.

Pour la vendange entière. — Au début de la fermentation il se produit une augmentation de la vitamine C, augmentation qui se poursuit pendant les deux ou trois premiers jours.

Puis on assiste à une diminution continuelle de la vitamine. Au début de la fermentation la vitamine de la pellicule diffuse dans le jus.

Il y a production simultanée de deux phénomènes inverses : enrichissement du jus en vitamine à partir des pellicules et disparition de la vitamine présente.

Pendant les premiers jours de la fermentation le phénomène d'enrichissement prédomine, par la suite seul le phénomène de destruction apparaît.

Cette diminution s'effectue avec la même vitesse que dans les jus de goutte.

Les vins de macération, dès la fin de la fermentation, renferment 60 à 70 p. 100 de la vitamine C du jus initial.

Ils sont donc, à ce stade, plus riches en vitamines C que les vins de goutte correspondants.

Donc, à la fin de la fermentation, les vins obtenus renferment encore la moitié ou les deux tiers environ de la vitamine initiale du jus correspondant, selon que la fermentation s'est produite en l'absence ou en présence des pellicules.

2° *Pendant la conservation des vins*

Au cours de cette période la vitamine C que les vins renferment continue à disparaître.

Aussitôt après la fermentation la chute est très rapide. Les vins de macération restent toujours légèrement plus riches que les vins de goutte.

Au bout de six mois de conservation, les vins ne renferment que des teneurs négligeables de vitamine C.

II. — RÉSULTATS POUR LES JUS DÉSULFITÉS

Ils sont représentés par le tableau 2.

1° *Pendant la fermentation*

Les courbes de fermentation (fig. 7) des jus désulfités, avec et sans levures, présentent un décalage assez important, supérieur à celui que l'on constate entre les jus frais témoins et levurés (fig. 8).

Les jus ensemencés sont entrés en fermentation dès le lendemain de leur préparation, on note pour les jus naturels un retard de deux jours.

Les fermentations étaient dans tous les cas pratiquement terminées le dixième jour.

Les déterminations de vitamine C ont été effectuées tous les jours pendant les dix premiers jours de la fermentation ; puis 15 jours, 2 mois et un an après.

Les jus utilisés, qui sont restés en présence de SO_2 pendant 8 mois, sont pauvres en acide ascorbique : 6,8 et 8 mg/l.

— Les jus n'ayant reçu aucune addition de vitamine C, levurés ou non, conservent leur faible teneur initiale de vitamine pendant toute la fermentation.

TABLEAU 2

Jus désulfités

Vitamine C totale en mg/l, pendant la fermentation, puis pendant la conservation du vin

Cépage		Jus avant fermentation	Vin après 10 jours de fermentation	Vin après 15 jours de conservation	Vin après 2 mois de conservation	Vin après 1 an de conservation
Listan	Jus	6,8	6	6	6	5,5
	Jus + vitamine C ...	59	49	42	31	8
	Jus + vit. C + levures	59	55	48	36,5	8
Hybride blanc n° 12375	Jus	8	7,5	7,5	5,5	5,5
	Jus + vitamine C ...	59	51	47	40	21
	Jus + vit. C + levures	59	56	55	51	30

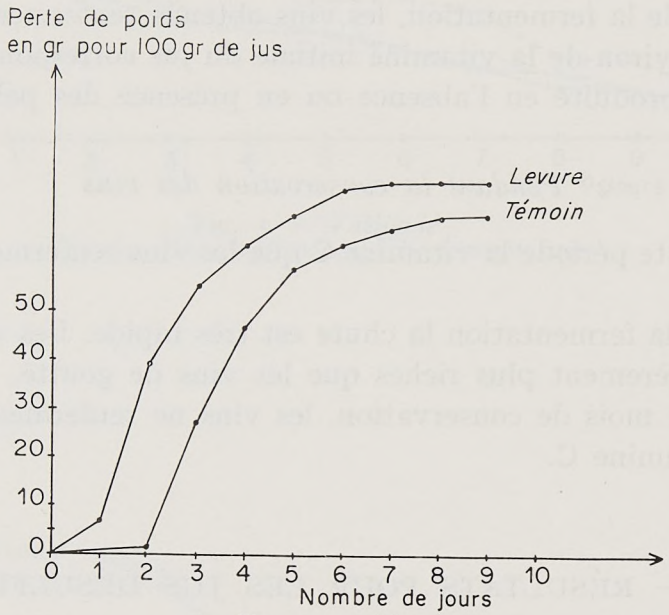


FIG. 7. — *Listan*
Jus désulfité. Courbes de fermentation avec et sans levures

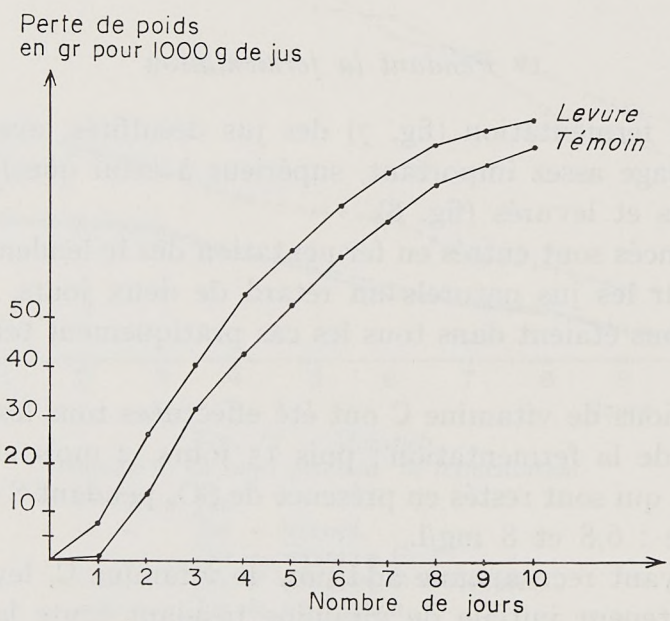


FIG. 8. — *Carignan rouge*
Jus frais. Courbes de fermentation avec et sans levures

— Les jus désulfités et enrichis en vitamine, contrairement aux jus frais correspondants, s'appauvrissent très peu en vitamine au cours de la fermentation. On observe une perte de 6 à 8 p. 100 pour les levurés et 12 à 15 p. 100 environ pour les non levurés.

Les jus levurés conservent mieux la vitamine ajoutée que les jus non levurés.

Ici les variations de vitamine, étant donné les faibles doses que renferment les jus de départ, portent uniquement sur la vitamine ajoutée.

2° *Pendant la conservation des vins*

Après la fermentation on assiste à une diminution de vitamine C qui s'accélère avec le temps. Les vins levurés restent toujours sensiblement plus riches que les non levurés.

Deux hypothèses peuvent être formulées pour essayer d'expliquer les comportements différents des jus frais et des jus désulfités envers la vitamine C et surtout envers la vitamine ajoutée.

Les jus désulfités ne renferment plus ou presque plus de substances agissant sur la destruction de l'acide ascorbique.

1. L'action du SO_2 sur le jus frais a comme conséquence une diminution notable des protéines, donc des enzymes qui, au cours de la fermentation, seraient responsables de la destruction de l'acide ascorbique.

L'étude de Monikowski et Chmielnicka, (1964), d'après laquelle l'acide sulfureux perturbe l'activité enzymatique de la peroxydase et diminue l'oxydation peroxydasique de l'acide L-ascorbique, pourrait peut-être contribuer à confirmer cette hypothèse.

2. Le SO_2 modifierait la structure de substances jouant le rôle d'intermédiaire dans l'oxydation suivie de dégradation de la vitamine C, ces substances pouvant être les dérivés polyphénoliques que renferment les jus frais.

III. — RÉSULTATS POUR LES VINS ENRICHIS EN VITAMINE C

Les résultats figurent dans le tableau 3.

D'après ces résultats, il apparaît que :

— la vitamine C ajoutée aux vins diminue pendant leur conservation. C'est au cours des deux premiers mois qui suivent l'addition de la vitamine que sa disparition est la plus importante. On constate des pertes variant entre 20 et 76 p. 100. Toutefois, après 12 mois, tous les vins enrichis renferment encore des proportions non négligeables de la vitamine ajoutée, d'après nos essais on en retrouve de 17 à 64 p. 100.

— la rétention de la vitamine varie avec le vin. Il semble que certains vins retiennent mieux que d'autres la vitamine qu'on leur a ajoutée, ils renferment peut-être des corps soit naturels, soit ajoutés, qui protègent la vitamine C.

On a alors essayé de comparer le pouvoir de rétention d'un vin vis-à-vis de la

vitamine C avec sa teneur en anhydride sulfureux. Les teneurs en SO_2 des vins considérés sont les suivantes :

Teneurs exprimées en mg de SO_2 total par litre

Vin rosé, « Pech Rouge »	125
Vin rouge, « Pech Rouge »	96
Vin rouge appellation « Corbières », « Pech Rouge »	47

Ici c'est le vin le plus riche en SO_2 total qui a conservé le moins bien la vitamine C ajoutée. C'est un vin rosé. Pour les deux vins rouges étudiés, c'est le contraire. Il semble donc que dans le cas des vins, la conservation de la vitamine C ajoutée dépend non seulement de la teneur en anhydride sulfureux, mais encore d'autres facteurs encore à déterminer.

TABLEAU 3

Évolution de la vitamine C ajoutée aux vins

Durée de conservation après l'addition de vitamine C	Vitamine C exprimée en mg/l								P. 100 de vitamine conservé après	
	0	15 jours	1 mois	2 mois	3 mois	6 mois	10 mois	12 mois	2 mois	12 mois
Vin rosé										
Témoin	7	7	7							
+ 50 mg/l de vitamine C..	58,3	39	26	20	15	18	18	16	34	27,5
+ 100 mg/l de vitamine C..	109	76	57	26	25	23	22	19	23	17,6
Vin rouge (« Pech-Rouge »)										
Témoin	4,5	4	4,8							
+ 50 mg/l de vitamine C ..	56	49	48	40	41	44	42	32	71	57
+ 100 mg/l de vitamine C..	106	96	93	84	85	86	79	68	79	64
Vin rouge (« Corbières »)										
Témoin	3	3,5	3,5							
+ 50 mg/l de vitamine C ..	53,5	42,5	35	20	17	19,5	15	18	37	33
+ 100 mg/l de vitamine C..	105	87	79	68	64	61	55,5	32	64	30,5

CONCLUSION

Malgré la teneur intéressante des jus de raisin frais en vitamine C, l'activité antiscorbutique d'un vin, âgé au moins de 6 mois, de goutte ou de macération, est pratiquement négligeable si l'on ne tient pas compte de la synergie entre vitamine C et facteur P.

Cette vitamine disparaît d'abord en grande partie pendant la fermentation, puis finit de disparaître pendant la conservation du vin.

Les jus désulfités se comportent différemment des jus frais, ils conservent

pendant la fermentation presque intégralement la vitamine ajoutée et les vins correspondants s'appauvrissent bien plus lentement pendant la conservation.

Les vins enrichis en vitamine C perdent pendant leur conservation une partie de cette vitamine.

La quantité de vitamine perdue varie avec le vin considéré, certains vins renferment encore au bout d'un an la moitié de la vitamine ajoutée.

Reçu pour publication en janvier 1966.

SUMMARY

EVOLUTION OF ASCORBIC ACID DURING ALCOHOLIC FERMENTATION OF FRESH AND DE-SULPHITED GRAPE JUICE AND STORING OF THE CORRESPONDING WINES

The author examines the following mediums : fresh grape juice, fresh grape juice + yeasts, fresh grape juice + C vitamin, fresh grape juice + C vitamin + yeasts, crushed grape, de-sulphited grape juice, de-sulphited grape juice + yeasts, de-sulphited grape juice + C vitamin, de-sulphited grape juice + C vitamin + yeasts, and follows the evolution of ascorbic acid during fermentation, then during the storing of the corresponding wines.

He then examines, as time goes, the comportment of the C vitamin added to finished wines.

He is carried to the following results :

As far as juices and fresh grapes are concerned, a great amount of natural and exogen vitamin first disappears during fermentation, then disappears during the storing of the wine.

For de-sulphited juices, an important proportion of exogen vitamin remains during fermentation, then slowly disappears during the storing of the wine.

Enriched with C vitamin wines, lose, during their storing a certain amount of said vitamin, the lost quantity varying with the type of wine.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

GENEVOIS L., RIBÉREAU-GAYON J., 1947. *Le Vin.* Hermann et Cie, Paris.

GUERASSIMOV M. A., WINOGRADOVA Mme N., 1931. La vitamine C dans le jus de raisin et dans le vin (en russe). *Travaux de la Station expérimentale et vinicole de Crimée,* Yalta, fascicule n° 3.

LODI M., 1943 d'après AMERINE M. A., 1954. Composition of wines. Organic. constituents. *Adv. food Res.*, **5**, 458.

MONIKOWSKI C., CHMIELNICKA E., 1964. Le rôle de l'acide sulfureux dans le processus d'oxydation peroxydasique de l'acide L-ascorbique en présence d'eau oxygénée. *Rev. Ferm. Ind. alim.* (Bruxelles), **13**, 113-120.

OURNAC Andrée, 1965. Dosage de l'acide ascorbique dans les vins et les jus fortement colorés. *Ann. Technol. agric.*, **14**, 341-347.

RANDOIN Lucie, 1928. Recherches sur la valeur alimentaire des jus de raisin frais et des vins au point de vue de leur teneur en vitamines. *Bull. Soc. Hyg. Alim.*, **16**, 464.

VENEZIA M., 1937-1938. Sull'acido ascorbico (vitamina C) nell'uva e nel vino R. Stazione sperimentale di viticoltura e di enologia Conegliano. *Annuario*, **7**.

Ann. Technol. agric., 1966, **15** (2) 193-202.

ACIDE ASCORBIQUE DANS LE RAISIN AU COURS DE SON DÉVELOPPEMENT

Andrée OURNAC et C. POUX

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 – Narbonne

SOMMAIRE

L'acide ascorbique total est déterminé dans le raisin, à partir de la formation du grain jusqu'à la sénescence.

Après la véraison, les déterminations portent séparément sur les pellicules et le jus.

Les acides totaux et les sucres sont dosés parallèlement.

INTRODUCTION

L'acide ascorbique est présent dans presque tous les tissus végétaux avec des concentrations différentes selon l'espèce et l'organe de ce végétal. C'est un agent important d'oxydo-réduction ; on admet que son activité physiologique repose sur la facilité avec laquelle il est capable de constituer un système rédox.

Son métabolisme dans les tissus végétaux a été très amplement étudié mais il ne semble pas encore qu'une hypothèse d'ensemble se soit dégagée de tous ces travaux. Sa concentration dans un tissu végétal donné peut être expliquée comme représentant la différence entre la vitesse de synthèse et la vitesse d'utilisation dans le métabolisme, pour le moment on ne possède pas de moyens exacts pour mesurer ces vitesses (Mapson, 1958).

Il est concentré principalement dans les zones de croissance active, particulièrement dans les bourgeons de feuilles et de fleurs (Reid, 1937). Le même auteur, en 1941, trouve que dans l'extrémité des racines, la transition de la phase embryonnaire à la phase d'élongation est accompagnée d'un accroissement de sept fois la teneur en acide ascorbique, et fait la suggestion intéressante que cette accumulation précède et conditionne l'élongation des cellules.

D'après Ulrich (1952), il n'est pas improbable que, par la suite, ce soit la chute de la teneur en vitamine qui commande la cessation de la croissance du fruit.

Le comportement de l'acide ascorbique dans le cas du raisin a été envisagé par plusieurs auteurs. GUERASSIMOV et VINOGRADOVA (1931) font ressortir que la quantité de vitamine C augmente au fur et à mesure de la maturation du raisin et que l'époque de la maturation dépassée, la période de surmaturation accuse une diminution de la vitamine. Les auteurs estiment eux-mêmes qu'étant donné la méthode de dosage utilisée, les chiffres qu'ils rapportent n'ont pas de valeur absolue, mais seulement une valeur relative, il faut uniquement tenir compte du sens des variations des teneurs trouvées.

VENEZIA (1937) détermine le taux de vitamine C dans le jus de quelques variétés de raisin pendant le cycle de la maturation. Il note de sensibles variations pendant la période de croissance. Dans le cas de raisins de table, ce taux est assez important dans le fruit vert, diminue, puis augmente pour égaler à la maturité ou même dépasser, ce qu'il était dans le raisin vert. Pour les raisins de cuve, il note une augmentation de la teneur en acide ascorbique au moment de la véraison puis une diminution, pour atteindre à la maturité une teneur inférieure à celle du jus de raisin vert.

D'après GENEVOIS (1938) et GATET (1939), le jus de raisin non complètement mûr est réducteur, cette réduction est due pour une grande part à de l'acide ascorbique, l'acide ascorbique total est inférieur à 100 mg par litre, l'acide ascorbique réduit à 70 mg/l. Les teneurs en acide ascorbique réduit tendent vers 0 lorsque le raisin mûrit, l'acide ascorbique oxydé diminue à son tour mais sans disparaître entièrement.

De ces travaux il ressort que certains ont permis de mieux préciser la localisation de la vitamine, d'autres de suivre ses variations au cours de l'évolution du grain.

Toutefois, étant donné les recherches réalisées sur le métabolisme de la vitamine C dans les végétaux en général, et les contradictions qui apparaissent dans le cas particulier du raisin à la suite de travaux déjà anciens, nous avons entrepris une étude sur le comportement de cette vitamine dans quelques variétés de raisins, de cépages méridionaux, depuis la formation du grain jusqu'à la sénescence.

I. — PROTOCOLE DES ESSAIS

Les cépages considérés sont : *Terret blanc*, *Aramon*, *Carignan rouge* et *Morastel* du domaine de Pech-Rouge (domaine expérimental I. N. R. A.).

Les raisins étaient prélevés tous les 8 jours, le matin pendant la période s'étendant du 1er juillet au 1er octobre. Les prélèvements étaient effectués selon la méthode de BENVEGNIN et CAPT (1955) et HUGLIN et JULLIARD (1959), aux ciseaux et non par arrachement.

On disposait pour chaque cépage de 600 à 800 grains que l'on répartissait en 6 à 8 lots de 100 grains chacun et égalisés en poids. Les déterminations comprenaient en plus de l'acide ascorbique. celles des acides totaux et des sucres, cela pour permettre de suivre l'évolution physiologique du grain, Un lot de 100 grains servait au dosage de la vitamine, un autre au dosage des acides et des sucres.

L'acide ascorbique était d'abord déterminé sur le grain entier, puis dès que cela a été possible, séparément sur le jus, les pellicules et la pulpe. Nous appelons pulpe ce qui reste du grain après avoir été pelé, écrasé et séparé du jus par centrifugation.

A — *Détermination des acides et des sucres*

On a pratiqué une extraction à l'eau après broyage et centrifugation des grains entiers. Sur une partie de ce liquide d'extraction on a titré l'acidité totale par la soude N/10. Les sucres ont été dosés par la méthode G. BERTRAND (1919) après défécation mercurique selon la technique de SÉMICHON-FLANZY (1926). A partir de la neuvième semaine, dès que l'on a pu peler les grains, les acides et les sucres ont été déterminés de la même façon uniquement sur le jus.

B — *Détermination de la vitamine C*

a) *Extraction.*

A partir du grain entier (jusqu'à la huitième semaine) les 100 grains échantillonnés étaient broyés au mixeur avec une solution d'acide métaphosphorique à 5 p. 100, puis centrifugés. Ces deux opérations étaient répétées un certain nombre de fois jusqu'à épuisement des parties solides en vitamine, ce que l'on a vérifié au moyen d'un lavage supplémentaire du résidu. Les liquides centrifugés renfermant la totalité de l'acide ascorbique étaient ramenés à un volume déterminé.

A partir des pellicules et de la pulpe (à partir de la neuvième semaine) :

Les grains de raisin étaient pelés au moyen de pinces ; les pellicules ainsi séparées étaient épuisées avec la solution de PO_3H à 5 p. 100 après broyage au mixeur. Les grains pelés étaient écrasés, puis centrifugés, le jus ainsi obtenu était mesuré et pesé. Le culot de centrifugation qui représente les membranes et le cytoplasme du fruit, était alors épuisé, par la solution à 5 p. 100 de PO_3H. Cette partie que nous appelons la pulpe ne renferme pratiquement pas de vitamine C.

b) *Dosage de la vitamine C.*

Il a été réalisé dans les extraits phosphoriques et dans le jus par précipitation à la dinitrophénylhydrazine selon la technique déjà exposée (OURNAC, 1965). Pour la défécation on a fait agir le sulfate de mercure sur l'extrait.

On obtient ainsi la vitamine totale : acide ascorbique + acide déhydroascorbique.

II. — EXPRESSION DES RÉSULTATS

Les résultats sont rassemblés dans les tableaux 1, 2 et 3 et exprimés de la façon suivante :

Poids : poids moyen de 100 grains en grammes ;

Acidité : en méq par 100 grains, tableau 1 et en méq pour 100 g de fruit, tableau 2 ;

Sucres : en grammes par 100 grains, tableau 1, et en grammes pour 100 g de fruit, tableau 2 ;

Vitamine C : elle est exprimée en mg de vitamine totale.

Elle est calculée :

— par 100 grains : pour le fruit entier, les pellicules, le jus, la pulpe, tableau 1 ;

— par 100 grammes de poids frais : fruit entier, pellicule et jus, tableau 2 ;

— par litre de jus, tableau 3 ;

Ces résultats sont illustrés dans la figure 1 qui reproduit uniquement les courbes relatives à un cépage : l'*Aramon* et donne une idée de la variation de l'ensemble des phénomènes observés.

III. — INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS ET DISCUSSION

A — *Variation de la vitamine totale dans 100 baies* (tableau 1, figures 1 et 2)

La teneur en vitamine du grain de raisin entier subit pendant son évolution plusieurs augmentations et diminutions alternatives. On peut distinguer quatre périodes au cours desquelles les variations de cette teneur ont un signe différent.

TABLEAU I

Résultats par 100 grains

	Date des prélèvements													
	2-7 1er	8-7 2e	15-7 3e	22-7 4e	29-7 5e	5-8 6e	12-8 7e	19-8 8e	26-8 9e	2-9 10e	9-9 11e	16-9 12e	23-9 13e	30-9 14e
Terret														
Poids en g	48	74	102	114	128	145	185	222	265	296	308	315	330	336
Acides totaux en méq	15,4	25,9	41,8	52,3	59,5	62	59,5	54,4	37,5	34,4	30	27,7	26,2	25,3
Sucres en g	0,226	0,480	0,840	0,125	1,66	3,4	11	18,8	25	30	34,8	35,1	37,6	41
Vitamine C fruit	9,6	12	18,2	18	15,8	19,3	16,4	17,6	12,4	15,8	14,3	14,4	11,5	12,5
Vitamine C jus									7,8	9,17	8,8	8,15	7,1	7,4
Vitamine C pellicule									3,6	5,6	4,7	5,3	3,4	4,1
Vitamine C pulpe									1	1	0,8	1	1	1
Aramon														
Poids en g	94	134	152	164	184	224	285	316	333	354	365	370	403	393
Acides totaux en méq	33,4	50,2	63,6	71,7	75,9	70	58,5	53,3	37,9	32,6	28,2	28,6	28,7	25,8
Sucres en g	0,450	0,770	1,180	1,87	4	14	23,4	28	30,5	35,8	41,7	41	46,3	45,5
Vitamine C fruit	14,2	18,3	22	19	14,5	13	18,2	20,1	17,2	23,6	21,7	19,6	16,8	15,3
Vitamine C jus									8,7	12,2	11,9	10,9	10,3	10,1
Vitamine C pellicule									7,5	10,4	9	7,5	5,5	4,2
Vitamine C pulpe									1	1	0,8	1,2	1	1
Carignan														
Poids en g	48	66	75	82	94,3	101	142	180	200	215	215	217	220	210
Acides totaux en méq	20	26,4	33,2	37,2	41	37,5	36,9	36,5	24,8	20,2	16,8	15	17,8	13,0
Sucres en g	0,297	0,420	0,617	0,8	1,85	4,6	13,7	19,5	23,6	27,3	29,4	29,6	29	38
Vitamine C fruit	13,2	14,2	15,4	16,9	11,2	14,1	14,0	18,8	15,7	20,0	19,0	20,8	13,9	
Vitamine C jus									8,5	11	9,5	9,6	7,2	6,2
Vitamine C pellicule									6,2	8	8,5	9,8	5,7	
Vitamine C pulpe									1	1,2	1	1,4	1	
Morastel														
Poids en g	42	83	100	101	116	137	183	218	245	260	267	258	260	256
Acides totaux en méq	17,2	31,7	41,5	44,7	53,8	54,7	55,5	53,8	39	35,7	32,1	29,5	27,2	24,6
Sucres en g	0,217	0,364	0,430	0,55	1,14	4,9	13,4	19	22,8	26,8	29,6	28,3	27,8	27
Vitamine C fruit	10,6	16,2	17,2	15,9	11,9	12,4	17	20,2	16,9	19,1	18,6	15,7	9,9	9,3
Vitamine C jus									8,5	11	11,6	9,5	6,2	5,8
Vitamine C pellicule									7,4	6,8	5,8	5,2	2,7	2,5
Vitamine C pulpe									1	1,3	1,2	1	1	1

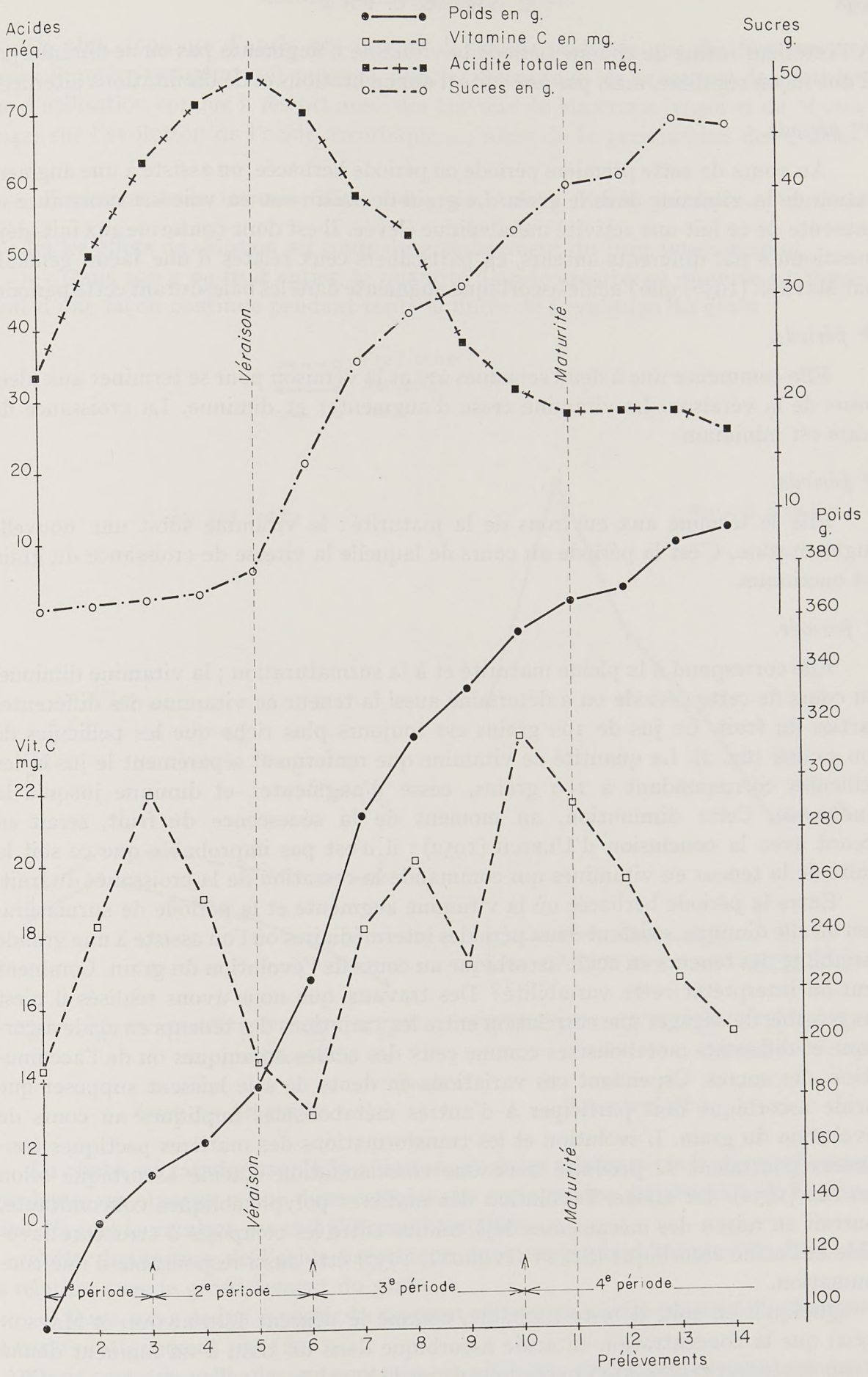


FIG. 1
Teneurs par 100 grains

A l'intérieur même de chaque période la vitamine n'augmente pas ou ne diminue pas d'une façon régulière, mais par une suite d'augmentations et de diminutions alternées.

1re période.

Au cours de cette première période ou période herbacée, on assiste à une augmentation de la vitamine dans le grain. Le grain de raisin est en voie de croissance et présente de ce fait une activité métabolique élevée. Il est donc conforme aux faits déjà mentionnés par différents auteurs, en particuliers ceux relatés d'une façon générale par MAPSON (1958) que l'acide ascorbique augmente dans les baiesdurant cette période.

2e période.

Elle commence une à deux semaines avant la véraison pour se terminer aux alentours de la véraison. La vitamine cesse d'augmenter et diminue. La croissance du grain est minimum.

3e période.

Elle se termine aux environs de la maturité : la vitamine subit une nouvelle augmentation. C'est la période au cours de laquelle la vitesse de croissance du grain est maximum.

4e période.

Elle correspond à la pleine maturité et à la surmaturation ; la vitamine diminue. Au cours de cette période on a déterminé aussi la teneur en vitamine des différentes parties du fruit. Le jus de 100 grains est toujours plus riche que les pellicules de 100 grains (fig. 2). La quantité de vitamine que renferment séparément le jus et les pellicules correspondant à 100 grains, cesse d'augmenter et diminue jusqu'à la sénescence. Cette diminution, au moment de la sénescence du fruit, serait en accord avec la conclusion d'ULRICH (1952) : il n'est pas improbable que ce soit la chute de la teneur en vitamines qui commande la cessation de la croissance du fruit.

Entre la période herbacée où la vitamine augmente et la période de surmaturation où elle diminue, existent deux périodes intermédiaires où l'on assiste à une grande variabilité des teneurs en acide ascorbique au cours de l'évolution du grain. Comment peut-on interpréter cette variabilité ? Des travaux que nous avons réalisés il n'est pas possible de dégager une corrélation entre les variations des teneurs en acide ascorbique et différents métabolismes comme ceux des acides organiques ou de l'accumulation des sucres. Cependant ces variations en dents de scie laissent supposer que l'acide ascorbique doit participer à d'autres métabolismes impliqués au cours de l'évolution du grain. L'évolution et les transformations des matières pectiques condensées pourraient se produire avec une consommation d'acide ascorbique selon KERTEZ (1951). De même, l'évolution des matières polyphénoliques concomitante, pourrait en raison des mécanismes déjà connus entre les composés à structure flavonoïde et l'acide ascorbique (SZENT GYORGYI, 1937) être aussi responsable d'une consommation.

Quoiqu'il en soit, il reste probable, comme le pensent ISHERWOOD et MAPSON (1962) que la concentration en acide ascorbique dans un tissu à un moment donné de son évolution représente l'excès fourni par la synthèse sur l'emploi dans les différents métabolismes.

De plus, toujours d'après ces auteurs, il semble probable que des facteurs externes (lumière-température) puissent affecter davantage les processus de synthèse que d'utilisation comme il ressort aussi des travaux de MENTZER (1940) et de MASSA (1942) sur l'évolution de l'acide ascorbique au cours de la germination des graines.

B — *Variation de la vitamine dans 100 g de matière fraîche* (tableau 2, figure 2)

Ici les effets de dilution au cours du grossissement du fruit interviennent.

— Dans 100 g de fruit entier, la quantité d'acide ascorbique diminue pratiquement d'une façon continue pendant toute la durée de l'évolution du grain.

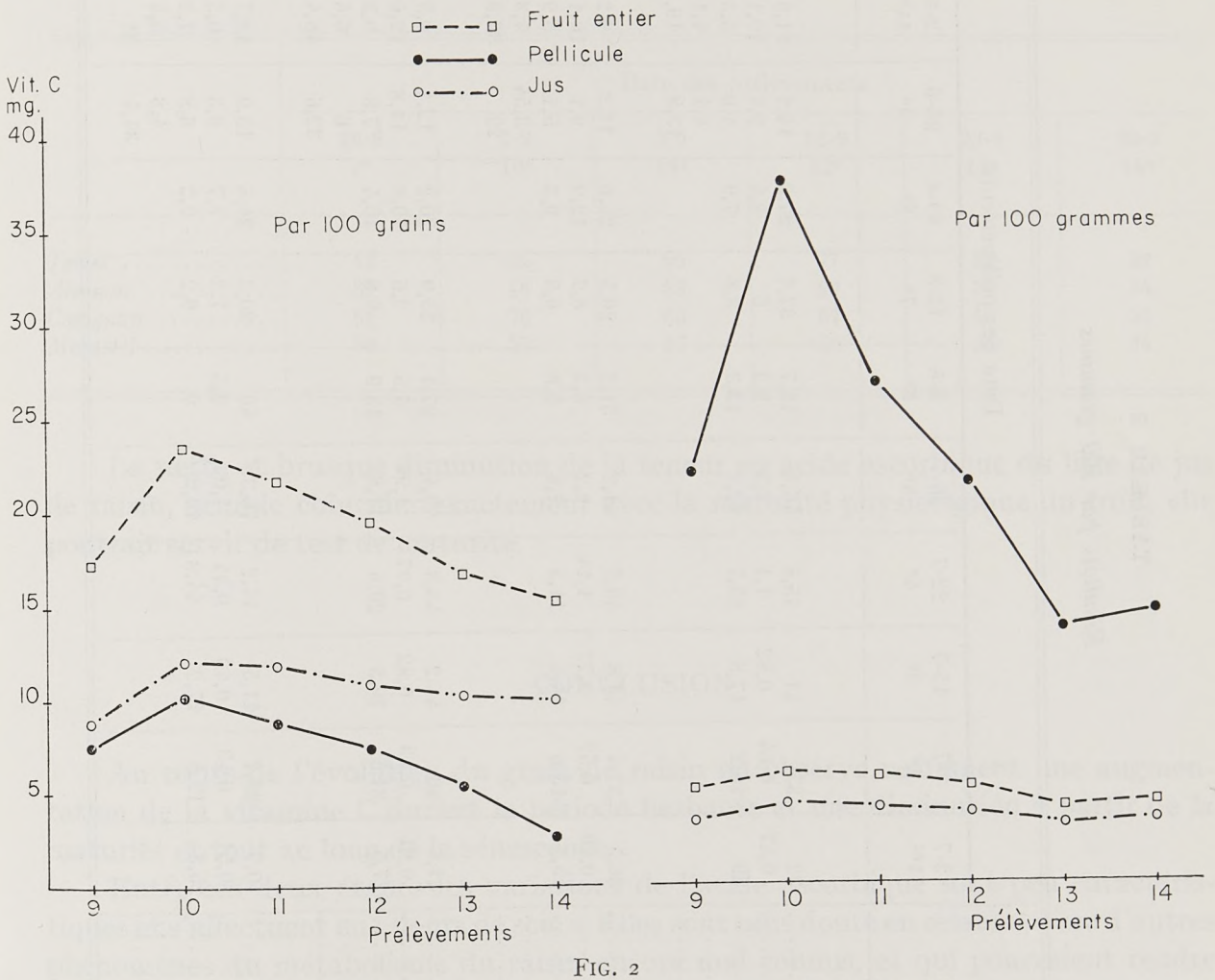


FIG. 2

Teneur par 100 grains *Teneur par 100 g*

La chute est rapide jusqu'à la véraison. Pour les raisins vérés la diminution est plus lente, on observe même dans certains cas une certaine stabilisation de la vitamine dès que la véraison est complètement terminée.

Cette diminution de l'acide ascorbique dans un poids déterminé de fruit est en relation avec le grossissement du grain.

— Dans 100 g de jus, à partir du moment où tous les raisins ont véré, la vitamine ne varie pratiquement pas (fig. 2).

Dans 100 g de pellicules, au contraire, la vitamine diminue rapidement pendant la période considérée (fig. 2).

TABLEAU 2

Résultats par 100 grammes

	Date des prélèvements													
	2-7 1er	8-7 2e	15-7 3e	22-7 4e	29-7 5e	5-8 6e	12-8 7e	19-8 8e	26-8 9e	2-9 14e	9-9 11e	16-9 12e	23-9 13e	30-9 14e
Terret														
Acides totaux en méq	32	35	41	45,8	46,4	42,7	32,1	24,5	14,1	11,6	9,7	8,7	7,9	7,5
Sucres en g	0,47	0,64	0,82	1,1	1,3	2,3	6	8,4	9,4	10,1	11,2	11,1	11,3	12,2
Vitamine C fruit	20	16,2	17,8	15,7	12,3	13,3	8,8	7,9	4,6	5,3	4,6	4,5	3,4	3,7
Vitamine C jus									4,1	4,1	3,8	3,5	3,0	3,0
Vitamine C pellicule									13,8	19,3	15,6	16,1	10,5	11,5
Aramon														
Acides totaux en méq	36,5	37,4	41,8	43,7	41,2	31,2	20,5	24,6	11,3	9,2	7,7	7,7	7,1	6,5
Sucres en g	0,48	0,57	0,77	1,14	2,2	6,2	8,2	12,9	9,1	10,1	11,4	11,0	11,4	11,5
Vitamine C fruit	15,1	13,6	14,4	11,5	7,8	5,8	6,3	9,3	5,1	5,9	5,7	5,2	4,1	4,4
Vitamine C jus									3,54	4,35	4,1	3,76	3,2	3,47
Vitamine C pellicule									22	37,8	26,8	21,4	13,7	14,7
Carignan														
Acides totaux en méq	41,6	40	44,2	45,3	43,4	37,1	25,9	20,2	12,4	9,3	7,8	6,9	8	6,1
Sucres en g	0,61	0,63	0,82	0,97	1,96	4,5	9,6	10,8	11,8	12,6	13,6	13,6	13,1	13,2
Vitamine C fruit	27,5	21,5	20,5	20,6	11,8	13,9	9,8	10,4	7,8	9,3	8,8	9,5	6,3	
Vitamine C jus									6	6,6	5,7	5,8	4,3	4
Vitamine C pellicule									32,6	48,4	48,5	46,6	28,5	
Morastel														
Acides totaux en méq	40,9	38,1	41,5	44,2	46,3	40	30,3	24,6	15,9	13,7	12	11,4	10,4	9,6
Sucres en g	0,51	0,43	0,43	0,54	1,0	3,5	7,3	8,7	9,3	10,3	11	10,9	10,6	10,5
Vitamine C fruit	25,2	19,5	17,2	14,8	10,2	9	9,2	9,2	6,8	7,3	6,9	6	3,8	3,6
Vitamine C jus									4,8	5,4	5,5	4,7	3,3	3,2
Vitamine C pellicule									34,4	31	26,3	21	10	8,1

(Notons que par rapport au poids de matière fraîche, les pellicules sont toujours plus riches en vitamine C que le jus.)

C — *Variation de la vitamine dans un litre de jus* (tabl. nº 3)

Dans un même volume de jus la vitamine C augmente régulièrement jusqu'à la maturité, puis diminue pendant la surmaturation.

TABLEAU 3

Vitamine C en mg/litre de jus

	Date des prélèvements					
	26-8 9e	2-9 10e	9-9 11e	16-9 12e	23-9 13e	30-9 14e
Terret	42	44	40	37	32	32
Aramon	37	46	43	40	34	34
Carignan	61	70	63	61	46	44
Morastel	50	57	57	50	34	34

La nette et brusque diminution de la teneur en acide ascorbique du litre de jus de raisin, semble coïncider exactement avec la maturité physiologique du fruit, elle pourrait servir de test de maturité.

CONCLUSION

Au cours de l'évolution du grain de raisin on observe nettement une augmentation de la vitamine C durant la période herbacée et une diminution à partir de la maturité et tout au long de la sénescence.

Entre ces deux étapes les variations de l'acide ascorbique sont peu caractéristiques et s'effectuent en « dents de scie ». Elles sont sans doute en relation avec d'autres phénomènes du métabolisme du raisin encore mal connus, et qui pourraient rendre compte de l'allure saccadée que prend l'évolution de la vitamine.

De toute façon, étant donné un nombre déterminé de grains, un poids déterminé de fruit frais, ou un certain volume de jus, l'acide ascorbique diminue à partir de la maturité.

Pour l'instant, ces observations sur la valeur antiscorbutique du raisin pendant son développement, peuvent être utilisées dans le choix de la date de la cueillette du fruit en relation avec sa richesse en acide ascorbique.

Ainsi, pour avoir un fruit ou un jus de fruit, de richesse maximum en acide ascorbique, il faudra effectuer la cueillette dès le début de la maturité.

Les pellicules peuvent enrichir notablement, comme c'est le cas des jus de raisin de macération, le produit obtenu, et cela d'autant plus que le fruit aura été

cueilli plus tôt. La macération réalisée sur des raisins surmûris ne provoquera pratiquement pas d'augmentation du jus en acide ascorbique. Plus on s'éloigne de la maturité physiologique, plus le raisin entier, son jus de goutte ou son jus de macération, seront pauvres en vitamine C.

Reçu pour publication en mars 1966.

SUMMARY

ASCORBIC ACID IN THE DEVELOPING GRAPE

Vitamin C content in different constituents of the grape (juice, pulp, pellicle) was determined in the course of the development of the fruit.

Four periods in the course of which the vitamin develops differently were distinguished :
— first, or herbaceous, period — the vitamin increases ;
— second period, which precedes ripening — the vitamin decreases ;
— third period, in the course of which there is maximum growth of the grape — the vitamin increases ;
— fourth period, which coincides with complete ripeness — the vitamin decreases.

In intrinsic value, the pellicle is always richer in vitamin C than the juice, but per grape the juice contains more vitamin C than the pellicle.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BENVEGNIN L., CAPT E., 1955. L'échantillonnage à la vigne pour l'évaluation de la maturité du raisin sur cep. *Annu. agric. Suisse*, **56**, 787-797.

BERTRAND G., 1919. *Guide pour les manipulations de chimie biologique.* H. Dunod et E. Pinat, Éditeurs. Paris, 86-100.

GATET L., 1939. Recherches chimiques sur la maturation des fruits. *Ann. Physiol. et Physico. Biol.*, **15**, 984-1064.

GENEVOIS L., 1938. Les substances réductrices au cours de la maturation du raisin. *Bull. Soc. Chim Fr* **5**, 579.

GUERASSIMOV M. A., WINOGRADOVA Mme N., 1931. La vitamine C dans le jus de raisin et dans le vin (russe). *Travaux de la Station expérimentale uvale et vinicole de Crimée.* Yalta, fascicule no 3.

HUGLIN P., JULLIARD B., 1955. Étude sur la morphologie, la phénologie et la productivité des principaux cépages de *V. vinifera* L. cultivés en Alsace. *Ann. Amélior. Plantes*, **4**, 5-51.

HUGLIN P., JULLIARD B., 1959. Le contrôle de la maturation du raisin par le prélèvement des baies. *Progr. agric. Vitic.*, 11-16, 37-41, CLII.

ISHERWOOD F. A., MAPSON L. W., 1962. Ascorbic acid metabolism in plants. Part II. Biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **13**, 329-350.

KERTESZ Z. I., 1951. *The pectic substances.* 157-158. Interscience publishers Inc., New York, Ltd London.

MAPSON L. W., 1958. Metabolism of ascorbic acid in plants. Part. I. Function. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **9**, 119-150.

MASSA V., 1942. L'acide ascorbique et la respiration au cours de la germination des graines de pois. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **24**, 1334-1339.

MENTZER C., 1940. Quelques données nouvelles sur l'acide ascorbique dans le règne végétal. I. L'acide ascorbique et la germination des graines. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **22**, 445-457.

OURNAC Mlle A., 1965. Dosage de l'acide ascorbique dans les vins et dans les jus fortement colorés. *Ann. Technol. agric.*, **14**, 341-347.

REID M. E., 1937 et 1941. D'après *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, 1958, **9**, 120.

SÉMICHON L., FLANZY M., 1926. Recherches sur la défécation des liquides sucrés par les sels mercuriques. *Ann. Fals. Fraudes*, **19**, 208-226.

SZENT GYORGYI A., 1937. D'après MAPSON L. W., 1958. Metabolism of ascorbic acid in plants. Part II Function. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **9**.

ULRICH R., 1952. *La vie des fruits* p. 226. Masson et Cie éditeurs, Paris (6e).

VENEZIA M., 1937-1938. *Sull'acido ascorbico-vitamina C-nell'uva e nel vino* R. Stazione sperimentale di Viticoltura e di Enologia Conegliano, *Annuario.*, **8**, 67-82.

Ann. Technol. agric., 1966, **15** (2), 203-209.

DÉTERMINATION RAPIDE DE LA NATURE OPTIQUE DE L'ACIDE LACTIQUE PRODUIT DANS LES FERMENTATIONS BACTÉRIENNES. SES APPLICATIONS DANS LA CLASSIFICATION DES *LACTOBACILLACEAE* WINSLOW ET *AL.*

P. BARRE
avec la collaboration technique de Marie-José AMOUROUX et A. DI NOTO

Station de Technologie agricole,
Centre de Recherches agronomiques du Midi, 34 – Montpellier

SOMMAIRE

L'acide L (+) lactique d'une culture bactérienne est dosé par voie enzymatique, à l'aide de la L (+) lacticodéshydrogénase du muscle de lapin. L'acide lactique total est dosé par voie chimique.

La différence entre les deux résultats précédents correspond à l'acide D (—) lactique.

Cette méthode a été appliquée à 59 souches bactériennes, isolées de vins, appartenant aux genres *Lactobacillus* BEIJERINCK et *Leuconostoc* VAN TIEGHEM. Elle doit permettre une classification plus précise de ces micro-organismes, en particulier dans le cas des Lactobacilles hétérofermentatifs.

I. — INTRODUCTION

La détermination de la nature optique de l'acide lactique produit à partir du glucose dans les fermentations bactériennes, présente un grand intérêt taxonomique dans le cas des *Lactobacillaceae*. Elle est un des critères de base de la classification de BERGEY.

Les méthodes utilisées jusqu'ici, reposent, dans la plupart des cas, sur deux propriétés essentielles des isomères optiques de l'acide lactique :

a) Le pouvoir rotatoire : le composé de configuration L est dextrogyre, celui de configuration D est lévogyre, ceci dans le cas des acides libres.

b) La teneur en eau d'hydratation du lactate de zinc cristallisé : 18,2 p. 100 dans le cas du sel racémique, 12,9 p. 100 pour les sels actifs.

Les conditions d'extraction et de purification du lactate de zinc à partir de l'acide lactique du milieu de culture, rendent ces méthodes très longues et délicates. De plus, le pouvoir rotatoire spécifique des deux antipodes est très faible. Aussi s'est-on orienté, pour l'exécution de ce test, vers l'utilisation d'enzymes spécifiques de chacun des isomères optiques.

— KITAHARA et FUKUI (1952) mesurent micromanométriquement la consommation d'oxygène due à l'oxydation de l'acide lactique par les lacticodéshydrogénases d'un extrait acétonique de *Lactobacillus plantarum* n° 11 ou de cellules séchées de *Lactobacillus batatas* KITAHARA (D lacticodeshydrogénase) d'une part, de cellules séchées de *Lactobacillus sake* KITAHARA (L lacticodeshydrogénase) d'autre part. Ils opèrent en présence de bleu de méthylène comme échangeur d'électrons.

— BARRE et GALZY (1962), mettent en évidence la présence de chaque isomère, en utilisant les lacticodéshydrogénases de la levure de boulangerie *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN cultivée en aérobiose (L (+) lacticodéshydrogénase) ou en anaérobiose (D (—) lacticodéshydrogénase).

Le présent travail a pour objet de mettre au point une technique enzymatique simple et précise, qui permette de déterminer rapidement les proportions de chaque composé.

II. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. — Matériel biologique

Les souches utilisées sont des bactéries isolées des vins du Languedoc (BARRE, 1966). Elles appartiennent aux genres *Lactobacillus* et *Leuconostoc*.

B. — Techniques de culture

Les fermentations du glucose sont conduites dans des erlenmeyers de 100 ml renfermant 60 ml du milieu suivant :

Yeast extract Difco : 4 g ; *Bacto Tryptone Difco* : 2 g ; glucose : 10 g ; acide ascorbique : 500 mg ; solution vitaminique complexe (1) : 2 ml ; eau distillée : 1 l ; pH 4,8. Stérilisation 110°C pendant 35 minutes. L'ensemencement est réalisé à partir d'une pré-culture de 4 jours sur le même milieu, et les fermentations conduites sous azote (1). Les déterminations sont faites au bout d'une semaine d'incubation à 28°C sur les milieux clarifiés par centrifugation et décarboniqués par agitation sous vide. Les teneurs en acide lactique atteignent dans ces conditions un minimum de 30 méq/l et les pH de fin de fermentation sont compris entre 3,1 et 3,5.

C. — Techniques analytiques

1 — *Dosage de l'acide lactique total*

a) Détermination de l'acidité fixe développée dans le milieu par différence entre l'acidité totale et l'acidité volatile entraînée à la vapeur d'eau (titration par la soude N/20), après avoir retranché à chacun de ces résultats, les chiffres trouvés pour le milieu non ensemencé. L'acidité fixe est, pour

(1) Voir BARRE, 1966.

la plupart des souches étudiées, directement assimilable à l'acide lactique. On vérifie toutefois par chromatographie sur papier selon CHEFTEL, MUNIER et MACHEBŒUF (1951) l'absence d'autres acides fixes que l'acide lactique.

b) Dosage par chromatographie sur résine échangeuse d'ions : selon la méthode CORDONNIER et BIZEAU (1960) modifiée selon un travail fait au laboratoire et non publié : les acides fixés sur résine Dowex n° 1 sous forme $HCOO^-$ sont élués par HCOOH 0,5 N. La fraction lactique passe du 35e au 65e ml. Une partie aliquote de cette fraction est oxydée par 5 ml de sulfate cérique environ N/10 à pH 1,5-1,8, et l'acétaldéhyde produit est dosé après distillation par la méthode de JAULMES et ESPEZEL (1935) à l'aide d'iode N/100. Pour des quantités de l'ordre de 3 mg d'acide lactique dans la prise, le rendement d'oxydation (1) est de 98 p. 100.

II — *Dosage enzymatique de l'acide L (+) lactique*

Il est basé sur la réaction suivante :

$$\text{L lactate} + \text{DPN}^+ \underset{\longleftarrow}{\xrightarrow{\text{L lacticodéshydrogénase}}} \text{pyruvate} + \text{DPNH} + \text{H}^+.$$

Par l'emploi d'hydrazine et d'un tampon à pH élevé (9 ou 9,5) on bloque respectivement la fonction cétonique du pyruvate et les ions H^+ libérés par la réaction, qui est ainsi totalement déplacée vers la droite et de façon stœchiométrique. L'apparition de DPNH est mesurée au spectrophotomètre à 340 mμ ; à partir de son coefficient d'extinction moléculaire à cette longueur d'onde : $6{,}22 \cdot 10^6$/mole/cm^2 (KORNBERG, 1957), on déduit le nombre de moles de lactate mises en réaction. Deux techniques différentes mises au point pour le dosage de l'acide lactique sanguin ont été adaptées et essayées.

a) *Méthode de* HOHORST (1963).

Réactifs

— Tampon glycine M Hydrazine 0,4 M pH 9,5 :

	pour 100 ml
Glycine	7,5 g
Sulfate d'hydrazine	5,4 g
Complexon III (sel disodique de l'E. D. T. A.)	0,2 g
Hydroxide de Sodium 2 N	51 ml
Eau bidistillée	q.s.p. 100 ml

— DPN 0,027 M :

20 mg de produit (2) renfermant 86,5 p. 100 de β DPN pour 1 ml d'eau bidistillée.

— Lacticodeshydrogénase :

suspension (2) renfermant 5 mg de protéine/ml à 360 UI./mg, pour 1 ml.

Mode opératoire.

Le milieu n'est pas déprotéinisé, mais dilué de façon à obtenir une concentration en acide L (+) lactique voisine de 0,1 μm/ml. Les dilutions les plus courantes sont 1/200 et 1/500.

Dans une cuvette de 1 cm d'épaisseur on introduit :

1 ml de tampon glycine hydrazine,
1 ml de milieu dilué,
0,1 ml de solution de DPN.

Après homogénéisation, la densité optique est mesurée contre un blanc contenant les mêmes réactifs, le milieu de culture étant remplacé par une dilution équivalente du milieu non ensemencé, dans le but d'éliminer l'influence de l'acide L (+) lactique contenu dans le *yeast extract* et la tryptone, et de compenser les variations de densité optique dues à l'absorption des complexes DPN-hydrazine et enzyme-DPN-hydrazine qui augmente avec le temps. Soit E_1 cette densité optique.

(1) Les rendements d'oxydation ont été calculés à partir du lactate de lithium BDH purifié par recristallisations successives dans l'éthanol et séchage des cristaux à 60° sous vide.

(2) DPN et lactico-déshydrogénase proviennent de la firme Boehringer Mannheim.

On ajoute 0,02 ml d'enzyme dans chaque cuvette puis on prend la densité optique toujours contre le blanc ; la lecture E_2 est faite lorsque cette densité est devenue stable. L'opération dure environ 12 minutes.

$$\Delta E = E_2 - E_1$$

$$\text{acide L (+) lactique en } \mu \text{ mole/ml} = \frac{\Delta E}{6{,}22} \times 2{,}12.$$

b) *Méthode de* LUNDHOLM, MOHME-LUNDHOLM *et* VAMOS (1963).

Elle se distingue essentiellement de la précédente par le pH adopté pour le déroulement de la réaction enzymatique : 9 au lieu de 9,5.

La libération d'ions H^+ dans le milieu réactionnel entraîne une variation de son pH, qui ne se produit pas dans le blanc. Cette évolution a pour effet de modifier l'absorption du complexe DPN-hydrazine de façon beaucoup plus sensible à pH 9,5 qu'à pH 9. C'est cette cause d'erreur que les auteurs ont cherché à éliminer.

Nous avons adopté cette technique au cas de nos milieux de culture en modifiant la face ionique du tampon et sa composition, ainsi que les prises des différents réactifs. De plus nous avons appliqué à cette méthode le principe de la double mesure avant et après addition d'enzyme.

Réactifs.

— Tampon glycine M, Hydrazine 0,8 M, pH 9

	pour 100 ml
Glycine	7,5
Sulfate d'hydrazine	10,4 g
Complexon III	0,2 g
Hydroxyde de sodium 2 N	q.s.p. pH 9
Eau bidistillée	q.s.p. 100 ml

— DPN et lacticodeshydrogénase : identiques aux réactifs de la méthode d'HOHORST.

Mode opératoire.

Il est identique au cas précédent avec les modifications suivantes :

— prise de DPN 0,2 ml ;

— température d'incubation des cuvettes 25°C. Il est commode, à ce point de vue, d'utiliser un spectrophotomètre thermostaté afin d'éviter toute manipulation des cuvettes entre les deux mesures.

Le temps de réaction peut atteindre 30 minutes.

$$\text{acide L (+) lactique en } \mu \text{ mole/ml} = \frac{\Delta E}{6{,}22} \times 2{,}22.$$

III. — RÉSULTATS

Détermination de l'acide lactique total

Les résultats obtenus par les deux méthodes concordent avec un écart de ± 4 p. 100. Cependant pour 4 souches présentant une légère croissance sur milieu sans glucose, l'écart atteint 10 p. 100 par défaut dans le cas du dosage par mesure de l'acidité fixe. Cela provient probablement de phénomènes de désamination par lesquels ces bactéries se procurent l'énergie nécessaire à leur croissance. Cet écart est fortement réduit par un raccourcissement de la durée d'incubation ou par l'emploi de cellules non proliférantes.

Détermination de l'acide L (+) lactique

Les deux techniques testées sur solution de DL-lactate de lithium et de L-lactate de calcium donnent des résultats parfaitement comparables. Sur des séries de 6 dosages effectués avec chacune d'entre elles, aucune différence significative n'a pu être relevée. On peut affecter à chaque résultat individuel un degré de confiance de 95 p. 100 pour une précision de ± 2 p. 100. Toutefois les mesures ont été faites en double pour détecter les résultats aberrants accidentels.

Nature optique de l'acide lactique

Le tableau 1 présente les résultats obtenus pour quelques souches caractéristiques : elles produisent soit de l'acide racémique, soit de l'acide L (+) ou encore de l'acide D (—). Certaines donnent les deux isomères en proportions différentes.

TABLEAU I

Nature optique de l'acide lactique produit par quelques souches de bactéries lactiques

Souches	Acidité fixe méq/l	Acide lactique méq/l	Acide L (+) lactique méq/l	Nature optique de l'acide lactique produit
I. — Souches homofermentatives				
Lactobacillus n° 63	62	60,5	61	L (+)
49	129	125	62	Racémique
5	49	48,5	37	78 % L (+) 22 % D (—)
II. — Souches hétérofermentatives				
Lactobacillus n° 15	56,5	55	27,25	Racémique
31	95	36,3	17,7	Racémique
99	45	47	22,3	Racémique
16	42,8	44	13,5	69 % D (—) 31 % L (+)
57	46,5	45	10,25	78 % D (—) 22 % L (+)
38	32	36	0	D (—)
Leuconostoc n° 9	40,5	42	0	D (—)
46	35	37	0	D (—)
32	28,75	28,65	0	D (—)

Selon la convention faite par KITHAHARA et OBAYASHI (1955), nous appelerons DL + D de telles souches donnant le composé D (—) en plus forte proportion que l'isomère L (+), et DL + L les souches donnant le résultat inverse. Cependant, pour tenir compte des erreurs commises sur les dosages de l'acide lactique total et de l'acide L (+), les souches donnant entre 47 p. 100 et 53 p. 100 d'un des isomères sont considérées comme formant de l'acide racémique. Le tableau 2 présente la répartition de ces différents types à l'intérieur de chaque groupe bactérien.

IV. — DISCUSSION ET CONCLUSION

a) Les lactobacilles homofermentatifs utilisés sont des souches non thermophiles ; ils se rangent, d'après ce test, dans deux espèces différentes :

— Les souches produisant de l'acide racémique : il s'agit de *Lactobacillus plantarum* (ORLA-JENSEN) HOLLAND.

— Celles produisant de l'acide L (+) ou DL + L : il s'agit alors de *Lactobacillus casei* (ORLA-JENSEN) HOLLAND.

TABLEAU 2

Nature optique de l'acide lactique produit par les différents groupes bactériens étudiés

Souches	Racémique	DL + L	L (+)	DL + D	D (—)
Lactobacillus :					
homofermentatifs	4	3	2	—	—
hétérofermentatifs	8	—	—	7	1
Leuconostoc	—	—	—	3	31

DL + L : souches donnant l'acide L en plus forte proportion que l'acide D.
DL + D : souches donnant l'acide D en plus forte proportion que l'acide L.

b) Les leuconostocs ne produisent que de l'acide D (—) lactique à l'exception de 3 souches produisant aussi de faibles quantités d'acide L (+).

L'ensemble de ces résultats concorde parfaitement avec les descriptions de la classification de BERGEY.

c) Les lactobacilles hétérofermentatifs sont séparés par ce test en deux catégories :

— les souches donnant de l'acide racémique ;

— les souches donnant de l'acide DL + D et, pour une souche, exclusivement de l'acide D (—).

La classification de BERGEY n'utilise pas la nature optique de l'acide lactique produit à partir du glucose, comme critère déterminant dans ce groupe. Les espèces décrites donnent « habituellement » de l'acide racémique. Or le tableau 2 montre qu'on trouve, parmi ces bactéries, une forte proportion de souches formant l'acide D (—), seul ou en mélange avec de faibles quantités d'acide L (+). La description par KITAHARA (1949) d'un lactobacille hétérofermentatif *Lactobacillus batatas* produisant l'isomère D (—) confirme nos résultats.

Il est mis ainsi en évidence, l'intérêt qu'il y aurait à utiliser cette détermination comme moyen de classification des souches appartenant au groupe des lactobacilles hétérofermentatifs. Il semble en effet illogique de négliger dans ce dernier cas, un

caractère auquel on donne une si grande importance dans le groupe voisin des lactobacilles homofermentatifs.

Le test que nous venons de décrire permet donc d'obtenir très rapidement des renseignements précis sur la composition de l'acide lactique produit à partir du glucose dans les fermentations bactériennes, en ses deux isomères. Le dosage de l'acide lactique étant indispensable pour la détermination du caractère d'homo ou d'hétérofermentativité, la reconnaissance de sa nature optique se réduit à un dosage enzymatique du composé L (+).

La simplicité avec laquelle ce test peut être dorénavant conduit, rend son exécution souhaitable pour tous les travaux de classification des bactéries lactiques d'intérêt technologique. En outre, les résultats obtenus pourront peut-être permettre un remaniement de la classification des lactobacilles hétérofermentatifs.

Reçu pour publication en mars 1966

SUMMARY

RAPID DETERMINATION OF THE OPTICAL NATURE OF THE LACTIC ACID PRODUCED IN BACTERIAL FERMENTATIONS. ITS APPLICATIONS IN THE CLASSIFICATION OF THE « LACTOBACILLACEAE » WINSLOW AND AL.

The optical nature of the lactic acid was determined by comparing enzymatic determination of the L (+) compound and chemical determination of the total lactic acid.

This method was applied to 59 strains of lactic acid bacteria isolated from wines. It is quick, accurate and allows the percentage of each isomer present on the medium to be determined.

Almost half the heterofermentative lactobacilli studied produce D (—) acid in a greater proportion than L (+) acid.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BARRE P., GALZY P., 1962. Étude d'un lactobacille homofermentatif isolé du vin. *Ann. Technol. agric.*, **11**, 121-130.

BARRE P., 1966. Recherches sur les bactéries lactiques isolées des vins. I. Isolement et classification. sous presse.

BREED R. S., MURRAY E. G. D., SMITH N. R., 1957. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 505-558, 7th edition, The Williams and Wilkins company, Baltimore.

CORDONNIER R., BIZEAU C., 1960. Séparation par chromatographie d'échange d'ions et dosage des acides lactique, succinique et malique du vin. *Ann. Technol. agric.*, **9**, 349-361.

HOHORST H. J., 1963. In BERMEYER H. U. *Methods of enzymatic analysis*, 266-270, Academic Press. New York.

JAULMES P., ESPEZEL P., 1935. Le dosage de l'acétaldéhyde dans les vins et spiritueux. *Ann. Fals. Fraudes*, **28**, 326-335.

KITAHARA K., FUKUI S., 1952. On the enzymes of lactic acid bacteria. Microdetermination of optically active lactic acid. *J. agric. Chem. Soc. Jap.*, **26**, 555-561.

KITAHARA K., OBAYASHI A., 1955. DL forming lactic acid bacteria. *J. Gen. appl. Microbiol. Jap.*, **1**, 237-245.

LUNDHOLM L., MOHME-LUNDHOLM E., VAMOS N., 1963. Lactic acid assay with L (+) lactic deshydrogenase from rabbit muscle. *Acta Physiol., Scand.* **58**, 243-249.

Ann. Technol. agric., 1966, **15** (2), 211-217.

NOTE DE LABORATOIRE

L'ISOLEMENT DES FLAVONOLS DU VIN PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DE CELLULOSE

M. BOURZEIX et P. BANIOL
avec la collaboration technique de N. HÉRÉDIA

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 – Narbonne

SOMMAIRE

Les recherches sur les flavonols du raisin et du vin prennent une importance croissante, notamment à cause des propriétés vitaminiques de ces polyphénols.

Dans le cas du vin, on constate qu'il n'existe pas de méthode adéquate d'isolement quantitatif des flavonols ; or la chromatographie sur couche mince peut conduire à une séparation fine des divers polyphénols, et en particulier des flavonols, sans qu'un traitement préalable du vin soit nécessaire et cette technique donne précisément la possibilité de récupérer facilement les flavonols isolés, en vue de leur dosage. De plus, elle est adaptée à l'étude simultanée de plusieurs vins.

Au cours des recherches entreprises dans cette direction on a d'abord sélectionné un support et des solvants de développement, puis on a appliqué le mode opératoire établi pour séparer les flavonols de nombreux vins.

INTRODUCTION

Les travaux récents sur les flavonols montrent l'intérêt croissant de ces polyphénols. Ceux-ci, notamment, s'avèrent plus efficaces que d'autres types polyphénoliques du point de vue d'actions physiologiques importantes sur l'organisme (travaux de PARIS et MOURY, en 1964, sur la résistance des capillaires).

Cependant il n'existe pas de méthode de séparation rapide des flavonols du vin.

Diverses techniques chromatographiques ou d'électrophorèse ont été expérimentées pour les isoler du raisin et du vin.

La chromatographie sur papier a permis à HENNIG et BURKHARDT (1960), puis à P. RIBÉREAU-GAYON de déceler la présence de flavonols dans les raisins.

Williams et Wender (1952), puis Vancraenenbroeck et ses collaborateurs (1963) sont parvenus à fractionner un mélange de quercétol et de deux de ses glucosides, la quercitrine et la rutine, sur colonnes échangeuses d'ions, mais au prix de fortes dilutions.

En 1961, Egger, puis Vancraenenbroeck et ses collaborateurs en 1963 et Bhandari en 1964 ont utilisé la chromatographie sur couche mince mais des extractions sélectives préalables sont nécessaires.

Dans ces conditions, avant d'entreprendre des recherches plus générales sur les flavonols des vins, on a été conduit à mettre au point un mode opératoire convenable de séparation de ces polyphénols.

TRAVAUX PERSONNELS

Le but recherché est, outre l'isolement des flavonols, la possibilité de récupérer facilement soit l'ensemble de ces colorants jaunes, soit l'un d'entre eux, de façon à pouvoir faire éventuellement un dosage ou une identification.

A partir d'un milieu comme le vin dont la composition polyphénolique est particulièrement complexe, la chromatographie apparaît comme la technique la mieux adaptée à ce problème.

Il convient cependant de choisir celle des techniques chromatographiques qui permette, outre une séparation fine, l'utilisation au départ d'une dose de vin suffisamment importante et aussi, après développement une récupération facile des flavonols par simple élution.

La chromatographie sur couche mince répond à ces exigences.

En utilisant la cellulose comme support il est aisé de récupérer les flavonols à partir de la poudre par élution après grattage. Le méthanol par exemple est un bon éluant.

Le choix des solvants de développement a été orienté surtout par le souci de séparer les anthocyanes, polyphénols principaux des vins rouges, des flavonols.

Les colorants rouges, qui dans le vin sont principalement sous forme de mono- et de diglucosides (J. Ribéreau-Gayon, E. Peynaud, 1958) sont hydrosolubles (Ch. Sannie, H. Sauvain, 1952).

Les flavonols, par contre sont moins solubles dans l'eau mais se dissolvent facilement dans certains solvants organiques (Ch. Sannie, H. Sauvain, 1952).

Divers solvants aqueux ont été expérimentés sans qu'il soit jamais possible d'obtenir une bonne séparation entre colorants jaunes et colorants rouges. Ce type de solvant, à migration rapide, donne presque toujours des traînées. Toutefois, un solvant aqueux qui évite ce dernier inconvénient a pu être sélectionné, bien qu'il donne une séparation imparfaite. Il s'agit de la phase inférieure du mélange de Delaveau (alcool isoamylique-acide acétique-hexane-eau 3v, 1v, 3v, 3v).

De nombreux solvants organiques à base d'alcools amyliques, de propanol et d'isopropanol, de butanol, d'heptanol et d'heptane, de benzène, d'acétone... etc., ont été expérimentés soit seuls, soit en mélange avec des solvants aqueux (après équilibre si deux phases apparaissent). La séparation recherchée n'est jamais obtenue avec une netteté suffisante. Les résultats les plus convenables sont observés avec

l'alcool amylique tertiaire saturé d'eau qui finalement a été retenu. Notons que ce solvant avait déjà été utilisé pour obtenir la séparation entre deux diglucosides anthocyaniques, celui du malvidol et celui du paeonidol (DEIBNER, BOURZEIX, CABIBEL-HUGUES, 1966).

Devant l'impossibilité de séparer les flavonols des anthocyanes par chromatographie monodimensionnelle on a fait appel à la chromatographie à deux dimensions. Celle-ci permet aux effets séparateurs du solvant aqueux de s'ajouter à ceux du solvant organique, le premier entraînant les anthocyanes en laissant les flavonols en arrière, le second aboutissant à des migrations inverses dans la seconde dimension.

On a utilisé des couches minces de cellulose (20 cm × 20 cm) de 0,5 mm d'épaisseur. La phase inférieure du mélange de DELAVEAU a servi comme solvant de développement dans la première dimension et l'alcool amylique tertiaire saturé d'eau pour le développement dans la direction perpendiculaire.

La révélation des taches des flavonols a été effectuée :

— par examen à la lumière ultra violette à l'aide du dispositif déjà décrit (L. DEIBNER, M. BOURZEIX, 1964) ;

— par action des vapeurs d'ammoniac, avec et sans examen U V ;

— par pulvérisations de divers réactifs : chlorure d'aluminium, acétate de plomb, etc., avec et sans examen U V (GAGE, DOUGLAS, WENDER, 1951 ; GEISSMANN, 1955).

On a séparé de cette façon les flavonols des vins rouges des principaux cépages du midi méditerranéen de la France, produits par divers modes de vinification et d'âges différents.

On se bornera à résumer ces essais en reproduisant les résultats obtenus :

1° à partir d'un mélange de flavonols du commerce (kaempférol (I), quercétol (I'), quercitrine et isoquercitrine, (III) et (III') rutine (V)) (reproduction 1) ;

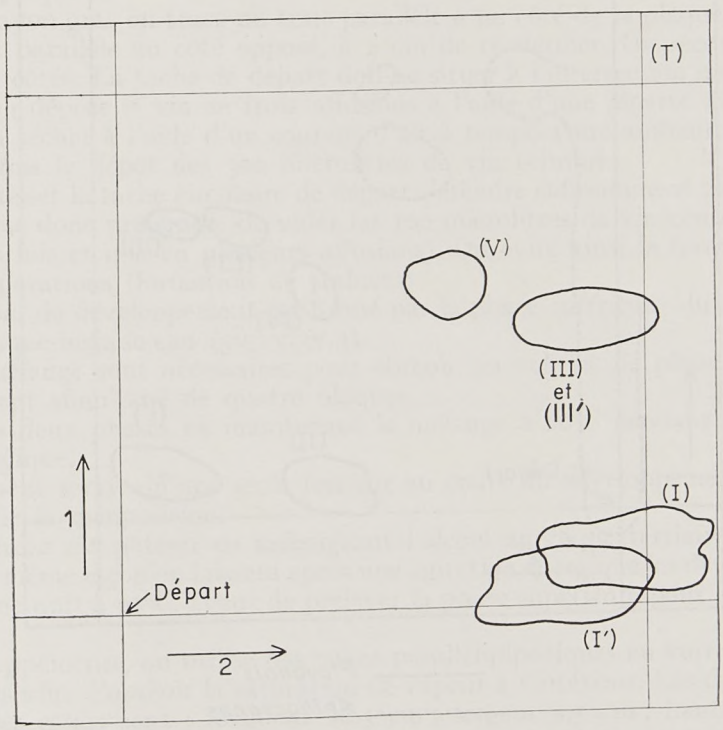


FIG. 1.

2° à partir d'un vin rouge d'hybride riche en anthocyanes diglucosides (cépage *S. V. 18 315*) (reproduction 2) ;

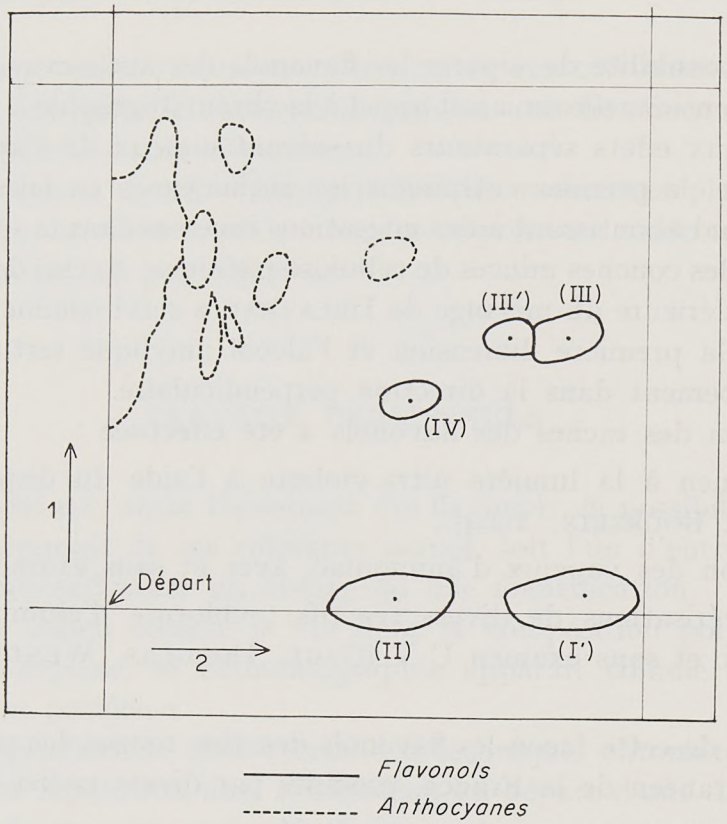


FIG. 2.

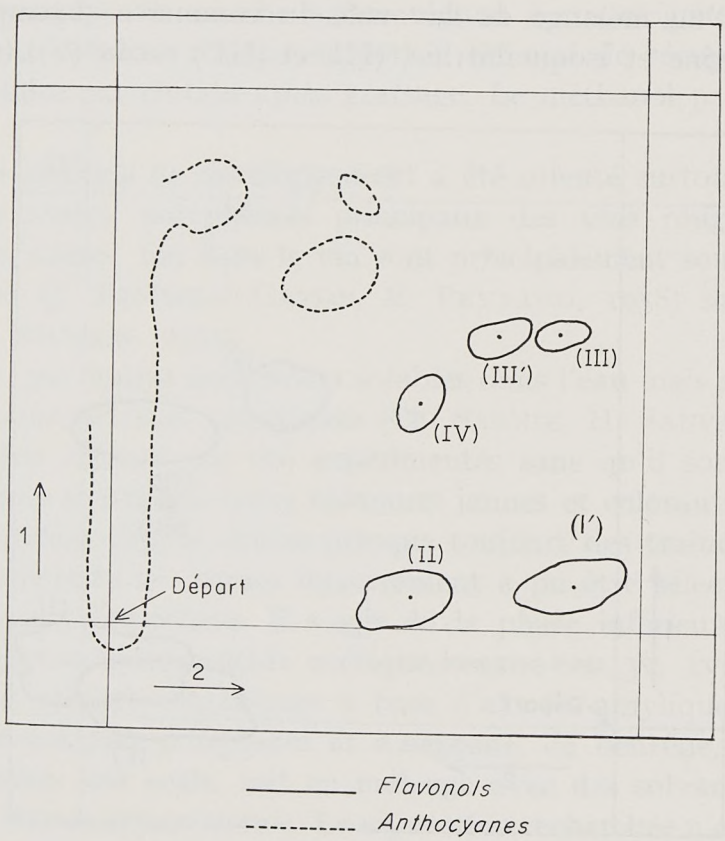


FIG. 3.

3° à partir d'un vin rouge de *V. vinifera* riche en anthocyanes monoglucosides (cépage *Carignan*) (reproduction 3).

Les reproductions 1, 2 et 3 montrent que :

— la méthode utilisée permet de séparer l'ensemble des flavonols des anthocyanes présentes dans les vins expérimentés. Ce résultat permet d'envisager la récupération des flavonols par élution et leur dosage à l'aide de méthodes déjà établies (RÖMISCH, 1960) ;

— les taches du quercétol et kaempférol chevauchent mais sont nettement séparées des glucosides du quercétol qui ont été expérimentés (quercitrine, isoquercitrine et rutine) ;

— dans le cas des vins, deux taches (II, IV) bien séparées correspondent à des flavonols encore non identifiés

Après ces résultats on s'est arrêté au mode opératoire suivant :

MODE OPÉRATOIRE

On utilise des plaques de verre, calibrées, carrées, de 20 cm de côté.

La poudre de cellulose utilisée est soit celle livrée par Macherey et Naegel (M. N. 300) ou encore celle de Serva (T. L. C.).

On mélange 15 g de la première à 100 ml d'eau distillée (pour la seconde il faut 25 g par 100 ml) dans un « mixer » à vitesse réduite pendant quelques secondes. Il s'agit simplement d'homogénéiser le mélange et non de broyer. L'emploi de la grande vitesse pendant plusieurs secondes diminue sensiblement la grosseur des particules de cellulose, ce qui se traduit par une augmentation considérable des durées de développement sans amélioration du pouvoir séparateur.

L'épaisseur la plus convenable de la couche est de 0,5 mm. Elle permet l'emploi d'une dose de vin assez importante (300 microlitres) et un séchage relativement rapide après les développements. Le séchage de la couche cellulosique après son élaboration se fait en laissant la plaque à température ambiante pendant une nuit au moins. 15 g (ou 25 g) de poudre additionnés de 100 ml d'eau permettent de préparer quatre plaques.

A l'aide d'un crayon gras on trace un trait parallèle à un côté de la plaque, à 3 cm de celui-ci, puis un second trait parallèle au côté opposé, à 2 cm de ce dernier. On recommence l'opération avec les deux autres côtés. La tache de départ doit se situer à l'intersection des deux traits tracés à 3 cm des bords. On dépose le vin en trois affusions à l'aide d'une pipette de 100 microlitres en prenant soin de bien sécher à l'aide d'un courant d'air à température ambiante, d'abord entre les affusions, puis une fois le dépôt des 300 microlitres de vin terminé.

Il convient de laisser la tache circulaire de départ s'étendre suffisamment ; son diamètre pourra atteindre 2 cm. (Il est donc préférable de vider les 100 microlitres de vin contenus dans la micropipette en une seule fois et non en plusieurs affusions). On évite ainsi la formation d'une croûte, gênante pour les séparations (formation de traînées)

Le premier solvant de développement est formé par la phase inférieure du mélange alcool isoamylique-acide acétique-hexane-eau (3v/1v/3v/3).

500 ml de ce mélange sont nécessaires pour obtenir un volume de phase inférieure suffisant pour le développement simultané de quatre plaques.

On équilibre les deux phases en maintenant le mélange à 20°C pendant une nuit au moins, après agitation énergique.

Ce solvant ne peut servir qu'une seule fois car au cours du développement le phénomène de démixtion en modifie la composition.

Le deuxième solvant est obtenu en mélangeant l'alcool amylique tertiaire à un volume égal d'eau distillée. De la même façon on laissera après une agitation énergique les deux phases en contact pendant au moins une nuit à 20°C, avant de prélever la phase supérieure pour le second développement.

Pour les développements, on utilise des cuves parallélipipédiques en verre, munies d'un couvercle à bords rodés afin d'obtenir la saturation de vapeur à l'intérieur. Les dimensions des cuves utilisées au cours des essais sont : longueur 20,5 cm ; largeur 8,5 cm ; hauteur 20,5 cm.

On peut, développer simultanément quatre plaques par cuve. Quelques minutes avant le début

du développement, le solvant de développement est versé au fond de la cuve, jusqu'à 1 cm environ, de façon à atteindre le plus rapidement possible la saturation de vapeur.

Le premier développement, à l'aide de la phase aqueuse du mélange de DELAVEAU est relativement rapide (une heure et demie environ à 20°C). On l'arrête lorsque le solvant arrive à 2-3 mm du trait supérieur tracé à 2 cm du bord de la plaque. La migration se poursuit en effet au cours du séchage, d'autant plus que celui-ci se fait par un courant d'air à température ambiante. Ainsi le liquide atteint le trait d'arrêt, à 2 cm du bord supérieur.

Après séchage on procède au développement dans la direction perpendiculaire. Le solvant utilisé est l'alcool amylique tertiaire saturé d'eau. Sa migration est beaucoup plus lente et demande environ 5 heures. Si on envisage de procéder ensuite à une élution des flavonols et éventuellement à leur dosage, il est impossible de procéder à l'ensemble de ces opérations en une seule journée. Dans ces conditions, il est préférable d'utiliser la nuit pour faire le second développement. Il y a un surdéveloppement en ce sens que le solvant dépasse le trait supérieur mais, l'expérience montre que la séparation et l'isolement des divers flavonols sont parfaitement obtenus en opérant dans ces conditions.

Notons que le séchage des plaques se fait en les maintenant horizontalement de façon à ne pas modifier l'emplacement des diverses taches.

Les flavonols apparaissent sous forme de taches jaunes. Certains toutefois ne sont qu'à l'état de traces. Il est donc préférable d'observer la plaque à la lumière ultraviolette. Le dispositif DEIBNER-BOURZEIX décrit dans une publication parue en 1964, permet une détection aisée des divers flavonols. En présence d'ammoniac d'intenses fluorescences jaunes apparaissent mais dès lors la nature chimique des flavonols se trouve modifiée. Il est donc nécessaire de faire la réaction à l'ammoniac ou à tout autre réactif sur un double.

Diverses autres réactions colorées signalées plus haut permettent d'identifier les flavonols en plus de l'utilisation de témoins commerciaux.

CONCLUSION

La chromatographie directe du vin sur couche mince de cellulose permet d'isoler les flavonols présents et d'envisager leur dosage global aprés élution.

Le mode opératoire établi conduit simultanément à la séparation individuelle de plusieurs de ces flavonols qu'il est ainsi possible d'obtenir facilement et en quantité suffisante pour leur identification et leur dosage.

Reçu pour publication en février 1966.

SUMMARY

ISOLATION OF FLAVONOLS FROM WINE
BY THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY ON CELLULOSE

Flavonols can be separated from red wine by two-dimensional chromatography on a thin layer of cellulose layer without previous treatment. This method of operation leads simultaneously to the individual separation of some of these polyphenols.

The possibility of eluting the flavonols from the cellulose powder for the purpose of quantitative analysis is envisaged.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BHANDARI P. R., 1964. Identification of Flavonoids in hops (*Humulus Lupulus Linne*) by thin layer chromatography. *J. Chromatogr.*, **16**, n° 1, 130-135.

DEIBNER L., BOURZEIX M., 1964. Recherches sur la détection des anthocyannes diglucosides dans les vins et les jus de raisin (par chromatographie sur papier et fluoroscopie des taches obtenues). *Ann. Technol. agric.*, **13**, 263-282.

DEIBNER L., BOURZEIX M., CABIBEL-HUGUES Mireille, 1964. Séparation des anthocyannes diglucosides par chromatographie sur couche mince et leur dosage spectrophotométrique. *Ann. Technol. agric.*, **13**, 359-375.

DEIBNER L., BOURZEIX M., CABIBEL-HUGUES Mireille, 1966. Sur la séparation du paeonoside et du malvoside dans les vins au moyen de la chromatographie multiple et bidimensionnelle sur couche mince de cellulose (*à paraître*).

DELAVEAU P. G., 1964. Essai de localisation de la biogénèse des flavonoïdes dans le genre *Tropaeolum*, Isolement de rutoside du *T. peregrinum* L. *C. R. Acad. Sci. Fr.*, **758**, 318-320.

EGGER K., 1961. Differenciation of types of glycosides of flavonols by thin-layer chromatography on polyamides. *Z. Anal. Chem.*, **182**, 161-166 et *Z. Naturforsch*, 16 *b*, 430.

GAGE T. B., DOUGLAS C. D., WENDER S. H., 1961. Identification of flavonoid compounds by filter paper chromatography. *Anal. Chem.*, **23**, 1582-1585.

GEISSMAN I. A., 1955. Anthocyanins, chalcones, aurones, flavones and related water-soluble plant pigments in PEACH K., TRACEY M. V., 1955, *Modern methods of plant analysis*, Vol. III, 450-498, Springer-Verlag. Berlin-Göttingen-Heidelberg.

HENNIG K., BURKAHRDT R., 1960. La séparation et la détection de la quercitrine et de la myricétrine dans les raisins et les vins. *Weinberg u. Keller*, **7**, N° 1, 16-22.

PARIS R., FAUGERAS G., 1959. Évaluation densitométrique de quelques flavonoïdes après séparation par électrophorèse sur papier. *Ann. Pharm. Fr.*, **18**, 29-36.

PARIS R., MOURY J., 1964. Action sur la perméabilité capillaire des divers types de flavonoïdes. *Ann. Pharm. Fr.*, **22**, N° 8-9, 481-493.

RIBÉREAU-GAYON P., 1964. Les composés polyphénoliques du raisin et du vin. *Ann. Physiol. vég.*, **6**, 211-244.

RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., 1958. *Analyse et contrôle des vins* (*composés phénoliques*). Librairie Polytechnique Ch. Béranger, 15, rue des Saints-Pères, Paris.

RÖMISCH H., 1960. Colorimetrische Bestimmung des rutingehalts in Pflanzenextracten und preparaten mit aluminium chlorid in mit Eissesig-Pyridin gepufferer lösung. *Die Pharmacie*, **15**, 33-38.

SANNIE Ch., SAUVAIN H., 1932. *Les couleurs des fleurs et des fruits Anthocyanes et flavones*. Éditions du Muséum, 37, rue Geoffroy-Saint-Hilaire, Paris, V^e^.

VANCRAENENBROECK R., LEMAITRE H., ROGIRST A., LONTIE R., 1963. Chromatographie des flavonoïdes sur échangeurs d'ions. *J. Pharm. Belg.*, 237-242.

VANCRAENENBROECK R., VANCREF A., LONTIE R., 1964. Chromatographie de flavonols sur couche mince d'échangeurs d'ions. In « *III^e^ Symp. inter. Chromatogr.*, Bruxelles, 1964 », p. 45-46, *Soc. Belge Sci. pharm.*, Bruxelles.

WILLIAMS B. L., WENDER S. H., 1952. The isolation and identification of quercetin and isoquercetrin from grapes (*Vitis vinifera*). *J. amer. Chem. Soc.*, **74**, 4372-4373.

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le manuscrit doit être dactylographié sur papier format 21 × 27, avec un double interligne, au recto seulement. Chaque page sera numérotée et des feuilles séparées seront utilisées pour les références bibliographiques, les tableaux, les légendes des figures et graphiques, etc.

Au début de chaque mémoire, on indiquera : — *le titre du mémoire:* il ne devra pas comporter d'abréviations ni de formules chimiques (sauf pour les isotopes) ; — *le nom des auteurs,* précédé des initiales du prénom pour les hommes, du prénom complet pour les femmes ; — *le nom des techniciens* ayant collaboré à l'étude relatée, précédé de la mention : avec la collaboration technique de... ; — *le nom de l'établissement,* dans lequel ont été effectuées les recherches et son adresse.

Les mémoires seront rédigés, autant que possible, d'après le plan ci-dessous :
a) *sommaire:* résumé suffisamment précis pour que sa lecture renseigne sur la nature du travail et son importance ; b) *introduction,* dans laquelle on indique l'objet des recherches entreprises en relation avec les travaux déjà effectués dans le domaine ; c) *techniques expérimentales et matériel utilisé,* en donnant, sous une forme concise, tous les détails nécessaires que pour le lecteur puisse répéter les expériences ; d) *résultats,* à présenter de la manière la plus brève possible ; e) *discussion et conclusion ;* f) *résumé* destiné à être traduit en anglais comportant une analyse *complète* de l'article ; g) *remerciements* pour les collaborations, les fonds, les dons... ; h) *références bibliographiques.*

Les travaux originaux en anglais doivent présenter la même composition que les mémoires rédigés en français, mais ils comportent obligatoirement un résumé français très *complet* placé en tête de l'article. Les figures, graphiques, tableaux et photographies seront sous-titrés en français.

Pour les autres documents (notes, mises au point, revues, rapports, etc.) l'auteur devra suivre un plan logique et le mettre en évidence par une titration appropriée.

Les références bibliographiques doivent être citées dans le texte de la manière suivante : (Dupont et Duval, 1954). Lorsque la référence comporte plus de trois auteurs, seul le premier auteur sera mentionné, suivi de : et *al.* A la fin de l'article, les références constituant la bibliographie doivent être citées par ordre alphabétique des noms d'auteurs, et par ordre de dates pour un même auteur.

Pour les articles : le (s) nom (s) de (s) auteur (s) suivi (s) des initiales du (des) prénom (s) ; la date de parution de l'article ; le titre de l'article (dans la langue originale pour l'allemand, l'anglais, l'italien, l'espagnol et en français dans tous les autres cas, avec indication entre parenthèses de la langue d'origine, sauf si l'auteur étranger a sous-titré dans l'une des quatre langues mentionnées) ; le titre du périodique en abrégé selon la World List of Scientific Periodicals, ou le Bulletin Signalétique du C. N. R. S. ; le volume ; la première et la dernière page de l'article.

Pour les ouvrages : le nom de l'auteur avec les initiales du prénom ; la date de l'édition ; le titre complet de l'ouvrage dans la langue originale, sans abréviations (pour les langues utilisant des alphabets autres que l'alphabet latin, la traduction du titre sera donnée entre parenthèses, avec mention de la langue d'origine) ; le volume ; la première et la dernière page du paragraphe se rapportant aux résultats discutés, et, si l'on cite l'ouvrage en entier, le nombre de volumes et le nombre total de pages ; le numéro de l'édition s'il y en a plusieurs ; le nom de l'éditeur ; le lieu de l'édition. Si l'ouvrage est collectif, on indiquera en plus le nom de l'auteur du chapitre cité, le nom des rédacteurs principaux, précédé de la mention « in », le titre de l'ouvrage.
La mention de « communications personnelles » ou « données non publiées » etc. doit être faite entre parenthèses. Lorsque l'auteur a relevé une référence dans une revue d' « Abstracts », le mentionner à la fin de la référence, entre parenthèses.

Les tableaux, dessins, graphiques, cartes, photographies, doivent être fournis à part. Les tableaux et figures doivent faire l'objet de deux numérations distinctes, en chiffres arabes l'une et l'autre.
Les auteurs peuvent disposer leurs tableaux soit dans le sens de la largeur de la revue, soit dans le sens de la longueur. Dans le sens de la largeur, le total des signes et des espaces disponibles est de 100. Dans le sens de la longueur, il est de 155. Les tableaux en longueur, c'est-à-dire ceux pouvant disposer de 155 signes, ne seront admis que s'ils comprennent plus de 8 lignes de chiffres, de manière qu'une page entière de la revue ne soit pas occupée par un tableau très long et très étroit.
Les graphiques ne doivent pas faire double emploi avec les tableaux.
Les légendes et les énoncés des graphiques et dessins doivent être dactylographiés sur feuille séparée, et porter les numéros des figures.

Les graphiques, schémas, cartes, dessins d'appareils seront envoyés *à l'état de projets,* leur exécution définitive étant confiée au Bureau de Dessin de l'I. N. R. A. Seules deux réductions à l'impression sont admises : *soit* × 0,5. *soit* × 0,25.
Il est rappelé que le format utile des Annales est : 19 × 12,5 cm ; ces dimensions ne doivent pas être dépassées

Photographies : Il est recommandé de fournir des épreuves bien contrastées sur papier blanc, et de préférence en format 9 × 12. Si les photographies doivent être associées pour constituer des planches, on adoptera les normes suivantes : 2 photos 9 × 12, 4 photos 9 × 5,5, 6 photos 5,5 × 5,5. Dans ce cas, chaque photo devra porter un numéro en chiffres arabes visible après clichage.
Les légendes des photographies doivent être dactylographiées sur feuilles séparées et porter les numéros des figures.

Correction des épreuves : les auteurs recevront deux épreuves à corriger. Les corrections « d'auteur » ne sont autorisées que sur le premier jeu d'épreuves.

Envoi du manuscrit : M. Flanzy, Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne (Aude) France, ou M. Mocquot, Station centrale de Technologie des Produits animaux, Jouy-en-Josas (Seine-et-Oise). Envoyer deux exemplaires.

Le Directeur-Gérant : M. L. CAGNAC

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 14-10-1966

Dépôt légal : 4e trimestre 1966. *N° d'impression : 1215.*

ANNALES
DE
TECHNOLOGIE
AGRICOLE

VOLUME 15 1966 NUMÉRO 3

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle - PARIS-7e

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs et de l'Institut national de la Recherche agronomique, à l'exception des sommaires et résumés

Ann. Technol. agric., 1966, **15** (3), 223-287.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES COMBINAISONS DE L'ANHYDRIDE SULFUREUX DANS LES MOÛTS ET LES VINS (1)

PREMIÈRE PARTIE (2)

J. BLOUIN

Station agronomique et œnologique, 33 - Bordeaux (3)

PLAN

INTRODUCTION

CHAPITRE PREMIER. — ÉTUDE DE LA COMBINAISON GLOBALE DE L'ANHYDRIDE SULFUREUX DANS LES MOUTS ET LES VINS

CHAPITRE II. — ÉTUDE DE LA COMBINAISON DE L'ANHYDRIDE SULFUREUX PAR DIFFÉRENTES SUBSTANCES

CHAPITRE III. — MÉTHODES ANALYTIQUES

CHAPITRE IV. — LES ACIDES CARBONYLIQUES DANS LES MOUTS ET LES VINS

CHAPITRE V. — LES COMPOSÉS CARBONYLÉS NEUTRES DES VINS

CHAPITRE VI. — LES ACIDES URONIQUES DANS LES MOUTS ET LES VINS

CHAPITRE VII. — BILANS DES DIFFÉRENTES FORMES DE L'ANHYDRIDE SULFUREUX DANS LES VINS

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

(1) Cette étude a fait l'objet d'une thèse de Docteur-Ingénieur, soutenue en le 1er décembre 1966, à la Faculté des Sciences de l'Université de Bordeaux.

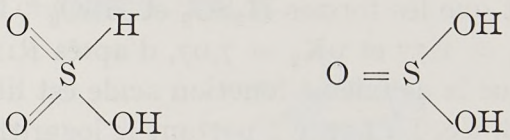
(2) La deuxième partie sera publiée dans le numéro 4, 1966, des Annales de Technologie agricole.

(3) Adresse actuelle : Centre d'Études et d'Informations œnologiques, 33 - Cadillac.

INTRODUCTION

Utilisé depuis des siècles pour l'entretien de la vaisselle vinaire, l'anhydride sulfureux est aujourd'hui employé de façon quasi universelle au cours de la vinification et de la conservation des vins ; on retrouve ce produit exogène dans pratiquement tous les vins de table. Il est donc essentiel de bien connaître ses effets et les facteurs de son efficacité, ce qui suppose une bonne connaissance de ses différentes formes et combinaisons dans les moûts et dans les vins.

Cette multiplicité de formes pose immédiatement le problème de sa dénomination exacte. En fait, il ne semble pas exister de terme à la fois simple, général et exact, car il existe simultanément de nombreuses formes « combinées » et « libres » et parmi ces dernières plusieurs possibilités moléculaires et ioniques telles SO_2, H_2SO_3, HSO_3^-, SO_3^{--}, $S_2O_5^{--}$, $SO_2\ x\ H_2O$, $HO—SO_2^-$, résultant des deux fonctions acides de l'acide sulfureux et de ses deux formes tautomères :



En conséquence, nous conformant aux usages de la Convention Internationale pour l'Unification des Méthodes d'Analyses et d'Appréciation des Vins (Paris, 13 octobre 1954), du décret du 24 juin 1963 fixant les méthodes officielles d'analyses des vins et des moûts en France et aux coutumes des analystes exprimant leurs résultats en « SO_2 », ainsi, qu'aux habitudes des praticiens indiquant les doses de sulfitage en « SO_2 » quel que soit le produit réellement employé, nous utiliserons l'expression « anhydride sulfureux », ou SO_2 par abréviation, de préférence à « acide sulfureux ».

Les effets œnologiques de l'anhydride sulfureux furent souvent étudiés depuis la fin du siècle dernier. Sans entrer dans les détails, rappelons qu'ils se rattachent à son activité antimicrobienne sélective vis-à-vis des différentes espèces de levures et de bactéries ; à son activité antidiastasique vis-à-vis des oxydases issues du raisin ou de sa microflore ; à son activité antioxydante ; à son action dissolvante vis-à-vis des matières colorantes des pellicules du raisin ; à son rôle floculant vis-à-vis des colloïdes du moût et enfin à son rôle bonificateur, en favorisant les développements de l'arôme au cours de la vinification, puis en bloquant des substances à odeur peu agréable au cours de la conservation des vins.

Le blocage chimique de l'anhydride sulfureux dû à sa grande réactivité avec les constituants du vin est une propriété importante aux points de vue technologique et hygiénique. En effet pour maintenir quelques mg de forme libre active, il est nécessaire d'avoir plusieurs centaines de mg de forme combinée inactive. Les différentes

législations vinicoles limitent fort heureusement la concentration maximale des vins en anhydride sulfureux total. Il serait donc de première importance de pouvoir réduire le rapport SO_2 inactif/SO_2 actif. Le but du présent travail est précisément l'étude des substances des moûts et des vins qui inactivent l'anhydride sulfureux en le combinant.

L'état actuel de nos connaissances sur ce problème a été récemment mis à jour par Ribéreau-Gayon et Peynaud (1960, 1961) et par Kielhöfer (1963), auteurs qui résument leurs travaux personnels, ainsi que ceux de Farnsteiner (1904), Kerp et coll. (1904, 1907, 1909), Paul (1914), Moreau et Vinet (1927, 1928, 1933, 1937*a* et *b*). Nous rappelerons brièvement ces connaissances.

Classiquement on distingue en œnologie « l'anhydride sulfureux libre », qui se trouve à l'état de gaz SO_2, d'acide H_2SO_3 et des sels $H\,SO_3^-$ et SO_3^{--}, directement titrable par l'iode en milieu acide, et l'anhydride sulfureux « combiné » obtenu par différence entre l'anhydride sulfureux total et l'anhydride sulfureux libre. En fait le gaz SO_2, ou anhydride sulfureux proprement dit, n'existe pas dans les vins, car il y réagit immédiatement avec l'eau pour donner l'acide sulfureux H_2SO_3 qui est en équilibre avec le gaz SO_2 contenu dans l'atmosphère proche du vin et qui est la seule forme perçue par l'odorat. Au pH des vins la forme H_2SO_3 ne représente que de 1 à 10 p. 100 de l'anhydride sulfureux libre, car l'acide sulfureux y est fortement salifié. Le taux de salification est directement déduit de la relation $\log \frac{S}{L} = pH - pK$ reliant la concentration de l'acide libre L à celle de l'acide salifié S en fonction du pH du milieu et du pK de la fonction acide considérée. Dans la gamme des pH des vins on ne rencontre donc en fait que les formes H_2SO_3 et HSO_3^-. En effet, d'après les pK de l'acide sulfureux ($pK_1 = 1{,}77$ et $pK_2 = 7{,}07$, d'après Ribéreau-Gayon et Peynaud, 1958) on calcule que la deuxième fonction acide est libre alors que la première fonction est fortement salifiée. La figure 1 portant le logarithme de la concentration

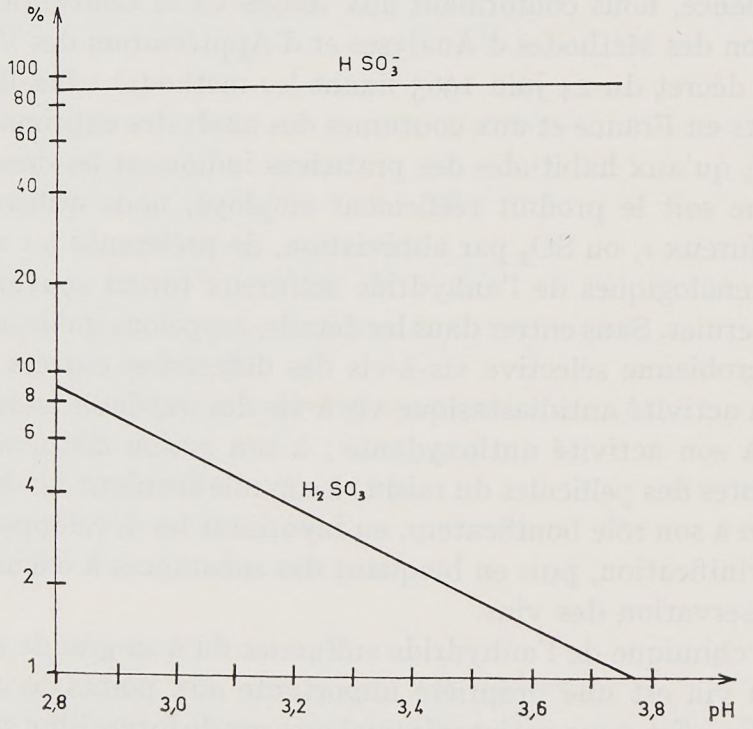


Fig. 1. — *Proportions relatives de l'ion HSO_3^- et de l'acide H_2SO_3 en fonction du pH, en solution aqueuse.*

en H_2SO_3 ou HSO_3^- en ordonnées et le cologarithme de la concentration en ions H^+ (ou pH) en abscisse, permet une détermination facile du « SO_2 actif ».

On sait en effet (Moreau et Vinet, 1937 ; Ingram, 1948 ; Ribéreau-Gayon et Peynaud, 1960-1961) que l'activité antiseptique du SO_2 est directement proportionnelle à la concentration de l'acide sulfureux H_2SO_3. Les autres formes, HSO_3^- ou même le gaz SO_2 anhydre, sont considérées comme sans action. D'autre part l'anhydride sulfureux libre est en équilibre avec l'anhydride sulfureux combiné. L'équilibre se déplace par diminution du SO_2 libre (oxydation, évaporation, combinaison), par addition de SO_2 et aussi sous l'action de la température dont l'élévation favorise la libération du SO_2 à raison de 1 à 1,3 mg par l par élévation de 1°C de la température (Ribéreau-Gayon et Peynaud, 1960-61.)

L'anhydride sulfureux combiné n'est pas directement oxydable par l'iode en milieu acide car il est engagé dans des combinaisons le masquant à l'oxydation. On crut longtemps qu'il n'y avait combinaison qu'avec l'éthanal et les sucres, mais des travaux récents ont montré que les sucres fixent très peu d'anhydride sulfureux ; en conséquence il existe bien d'autres substances fixatrices. Outre l'éthanal, le glucose et l'arabinose, il y a certainement combinaison avec le diacétyle et l'acétoïne mais les quantités présentes sont très faibles, quelques mg par l tout au plus. On a également signalé une fixation de SO_2 sur les liaisons disulfures des protéines et les fonctions cétones apparaissant sur les polyphénols (Ribéreau-Gayon et Peynaud, 1960-61), Mais l'explication est encore très partielle. En définitive, 20 à 80 p. 100 de l'anhydride sulfureux combiné restent inexpliqués. L'ensemble de ces résultats peut être schématisé comme ci-dessous (fig. 2).

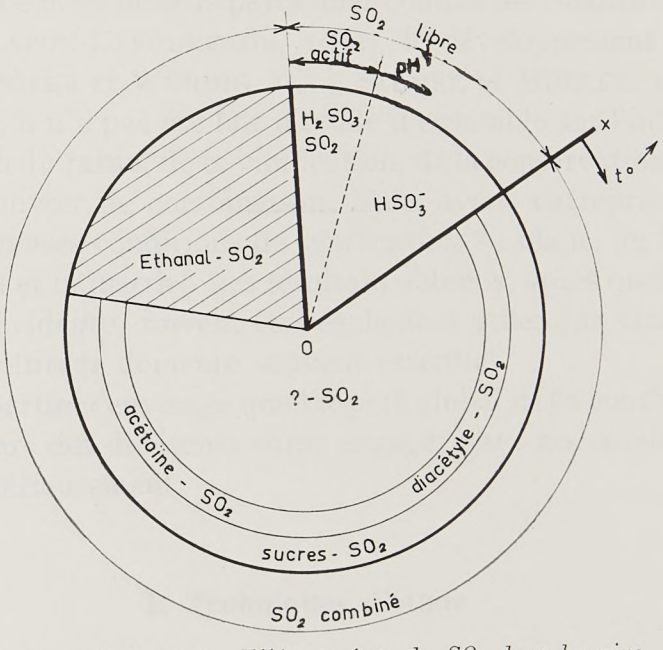


Fig. 2. — *Schéma des différents états du SO_2 dans les vins d'après les connaissances au début de nos travaux.*

Le segment hachuré correspond à la fraction du SO_2 combiné fixe et définitive.
Le rayon Ox mobile autour du point O matérialise la réversibilité des autres combinaisons.

Tel était, brièvement résumé, l'état des connaissances sur la combinaison de l'anhydride sulfureux dans les vins, lorsqu'en 1960 on constata un taux de combinaison extrêmement élevé, et au premier abord inexplicable, dans la quasi-totalité des

vins blancs du Bordelais. M. le Professeur Jean RIBÉREAU-GAYON nous confia alors l'étude de ce problème.

Notre travail étudie successivement : la combinaison globale dans les moûts et les vins et la détermination correcte de leur pouvoir de combinaison ; les différents facteurs de cette combinaison ; la fixation de l'anhydride sulfureux par diverses substances pouvant exister dans les vins et les caractéristiques de leurs combinaisons, en particulier la détermination de la constante de dissociation chimique ; les méthodes analytiques utilisées pour caractériser et doser ces substances ; leurs teneurs dans les moûts et les vins en fonction des conditions de fermentation et de conservation ; l'établissement de bilans assez approchés de l'état de l'anhydride sulfureux dans un grand nombre de vins. Cette étude nous a permis de dégager les causes des combinaisons normales et anormales de l'anhydride sulfureux ; elle est donc la base et le point de départ d'études d'application permettant d'envisager de réduire ces taux de combinaison en évitant la présence ou la formation des substances fixatrices d'anhydride sulfureux.

CHAPITRE PREMIER

ÉTUDE DE LA COMBINAISON GLOBALE DE L'ANHYDRIDE SULFUREUX DANS LES MOÛTS ET LES VINS

Nous avons vu que pour maintenir dans les vins quelques mg par l de SO_2 « actif », il faut avoir quelques dizaines de mg de SO_2 « libre » et quelques centaines de mg de SO_2 « total », et qu'il serait au point de vue pratique très important de pouvoir réduire le rapport SO_2 inactif/SO_2 actif. Dans ce but nous avons entrepris une étude générale des variations de ce rapport, ou plus exactement du rapport SO_2 libre /SO_2 total, le SO_2 actif étant directement fonction du SO_2 libre pour un vin donné.

Cette question a été souvent étudiée, depuis les travaux fondamentaux de Kerp, Paul, Farnsteiner et Wöhler (1904-09), soit pour prévoir la fixation d'anhydirde sulfureux dans un moût ou un vin donné (Moreau et Vinet, 1927), soit pour étudier l'influence d'un facteur particulier comme les conditions du mutage des vins (Peynaud et Lafon-Lafourcade, 1952), le développement de la pourriture sur les raisins (Kielhöfer et Würdig, 1959, Stühr et Müller, 1961). Par contre, à notre connaissance, il n'a pas été fait d'étude d'ensemble sur l'influence des conditions de la maturation du raisin, de la vinification, de la conservation et du traitement des vins sur leur pouvoir de combinaison. Nous avons entrepris de réaliser cette étude dans de nombreuses conditions de vinification en blanc, au laboratoire et aux stades semi-industriel et industriel. Les résultats obtenus, après quelques adaptations dont la nécessité est évidente, doivent être également utiles à la vinification en rouge où le problème du sulfitage demeure souvent essentiel.

Cette première partie n'envisage que l'aspect global de la combinaison et néglige la nature et les teneurs des différents corps engagés dans ces combinaisons ; ce problème sera étudié ultérieurement.

I. Techniques d'étude

1. *Détermination du pouvoir de combinaison vis-à-vis de l'anhydride sulfureux*

Cette détermination, ou plus simplement détermination du « pouvoir de combinaison » comme nous l'écrirons désormais pour simplifier, est ainsi réalisée. Pour chaque échantillon étudié, nous préparons trois lots différents additionnés de SO_2 de façon à obtenir environ 20, 50 ou 100 mg de SO_2 libre au bout de trois à cinq jours.

Nous utilisons habituellement trois bouteilles de 90 ml pleines, bouchées au liège et conservées couchées entre le sulfitage et l'analyse. Les milieux susceptibles de fermenter sont stabilisés par une addition massive de captane (environ 100 mg par l) qui ne perturbe généralement pas les analyses ultérieures. Seule la détermination de la « correction du SO_2 » dans le dosage de l'acidité volatile est entachée d'une forte erreur par excès en présence de captane pour les milieux privés de cuivre (moût stérilisé à chaud, vin traité en fin de fermentation). On remédie simplement à cette erreur, due à l'apparition dans le distillat de substances oxydables par l'iode en milieu alcalin, par l'addition de quelques µg de sulfate de cuivre au milieu à distiller.

On dose le SO_2 libre, les « réductones » et le SO_2 total comme indiqué plus loin, obtenant ainsi trois états différents de la combinaison du SO_2 pour l'échantillon considéré en fonction du taux de SO_2 libre. Il est ainsi possible de caractériser le pouvoir de combinaison de cet échantillon.

2. *Expression du pouvoir de combinaison*

Le bilan de l'anhydride sulfureux dans un vin est habituellement exprimé par les teneurs en SO_2 libre, total et combiné. Cette représentation simple convient bien pour caractériser un état particulier mais se prête mal aux comparaisons de différents échantillons ou de divers états d'un échantillon qui évolue car les trois teneurs ne sont pas reliables entre elles de façon simple.

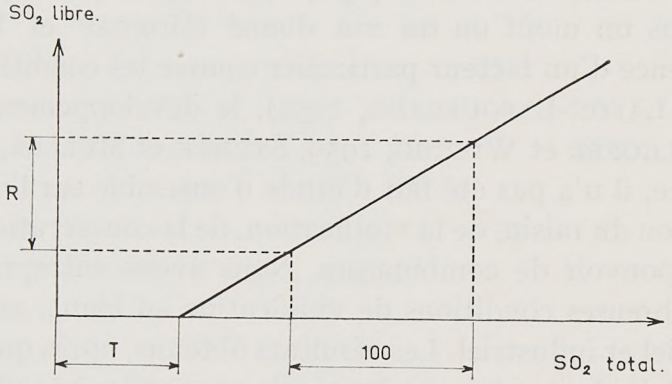


FIG. 3. — *Représentation graphique de la combinaison du SO_2 selon* MOREAU *et* VINET.

MOREAU et VINET (1927) ont proposé de caractériser un échantillon par deux indices T et R, représentant respectivement l'anhydride sulfureux totalement combiné et le taux de combinaison pour un accroissement de 100 mg de SO_2 libre (fig. 3), mais en pratiquant des additions massives de SO_2. BENVEGNIN et coll. (1951) ont repris cette représentation en utilisant des sulfitages modérés correspondant aux doses habituelles dans la conservation des vins.

Ces deux techniques peuvent rendre service dans la pratique des sulfitages, mais toutes deux, surtout la première, manquent de précision. En effet, la courbe de combinaison n'est pas une droite, mais une courbe qui n'est assimilable à une droite que sur de courts tronçons. D'autre part, il est souvent plus intéressant de relier directement SO_2 libre et SO_2 combiné.

C'est ce qu'ont fait RIBÉREAU-GAYON et PEYNAUD en caractérisant un vin par sa teneur en SO_2 combiné pour 100 mg de SO_2 libre ; le calcul se fait par une règle de

trois en supposant un taux moyen de combinaison de 1/3. Cette technique permet de comparer des vins différents, elle a une certaine valeur pratique pour régler le sulfitage mais elle suppose un taux de combinaison constant. Or, le pouvoir de combinaison et les corps qui en sont responsables sont variables et la précision, convenable pour les vins normaux ayant environ 100 mg de SO_2 libre, devient médiocre lorsqu'on s'éloigne de cette valeur.

KIELHÖFER et WÜRDIG (1960 *b*) relient graphiquement les teneurs en SO_2 libre et combiné d'un vin. La courbe obtenue (fig. 4), d'allure logarithmique, fait clairement ressortir que le SO_2 combiné s'accroît avec le SO_2 libre, mais que l'augmentation de SO_2 combiné est de moins en moins rapide lorsque la teneur en SO_2 libre s'élève, ce qui est caractéristique, d'un équilibre. Cette courbe est spécifique d'un vin donné et permet les comparaisons.

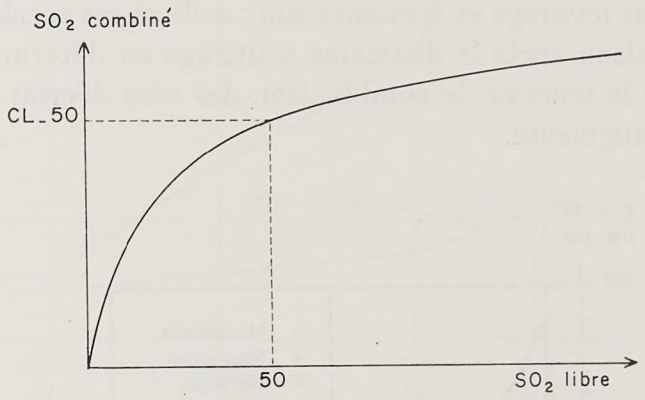


FIG. 4. — *Représentation graphique de la combinaison du SO_2 selon* KIELHÖFER *et* WÜRDIG.

Personnellement nous avons adopté une représentation simplifiée du pouvoir de combinaison des vins par une seule valeur qui est le SO_2 combiné (C) pour un taux déterminé du SO_2 libre (L). Par exemple, le SO_2 combiné pour 50 mg de SO_2 libre est représenté par « C-L 50 ». Pour les vins blancs secs, on peut adopter de préférence le « C-L 15 » et pour les vins blancs doux le « C-L 100 », valeurs technologiquement plus intéressantes. (Dans la suite de ce travail nous adopterons la dénomination générale « vins doux », par opposition à « vins secs », pour tous les vins ayant plus de 3 g de sucres réducteurs par litre. Nous négligeons ainsi les subdivisions en « demi-secs » « moelleux » et « liquoreux », dont les limites sont peu précises et variables selon les régions).

Nous représenterons de même le SO_2 « résiduel », c'est-à-dire (selon l'expression « *Rest* SO_2 » de KIELHÖFER) la partie du SO_2 combiné qui n'est pas fixée à l'éthanal ou au glucose, en fonction du SO_2 libre et par analogie nous déterminerons le « R-L 50 ». Cette valeur et le « C-L 50» sont plus faciles à interpréter que les valeurs Cx et K de KIELHÖFER donnant la concentration et la constante de dissociation des corps fixant le SO_2 résiduel. En effet ces calculs supposent, pour être valables, qu'il n'existe qu'un seul composé fixant le SO_2 résiduel et nous verrons qu'il n'en est rien.

Disposant maintenant d'un procédé simple et valable pour représenter graphiquement ou par chiffres la combinaison de l'anhydride sulfureux, nous pouvons étudier les résultats des nombreux essais industriels, semi-industriels ou de laboratoire que nous avons conduits en 1961, 1962 et 1963.

II — Influence de l'état du raisin sur le pouvoir de combinaison des moûts et des vins

1. *Influence du degré de maturité*

Au cours de deux essais différents nous avons mesuré le pouvoir de combinaison de plusieurs moûts et vins issus de raisins plus ou moins mûrs.

Raisins sains et triés. — Dans une même parcelle de vigne divisée en trois parties respectivement plantées en *Sémillon*, *Sauvignon* et *Muscadelle* on effectue trois prélèvements homogènes ; on récolte un cep sur trois sur plusieurs dizaines de ceps les 27 septembre, 3 octobre et 9 octobre 1962, puis on trie les raisins totalement exempts de pourriture. Ces neuf lots sont vinifiés identiquement avec sulfitage à 50 mg par litre avant levurage et fermentation ; celle-ci est totale. On compare leur pouvoir de combinaison après le deuxième soutirage en déterminant le C-L 15. La figure 5 montre que le pouvoir de combinaison des vins décroît lorsque le degré de maturité du raisin augmente.

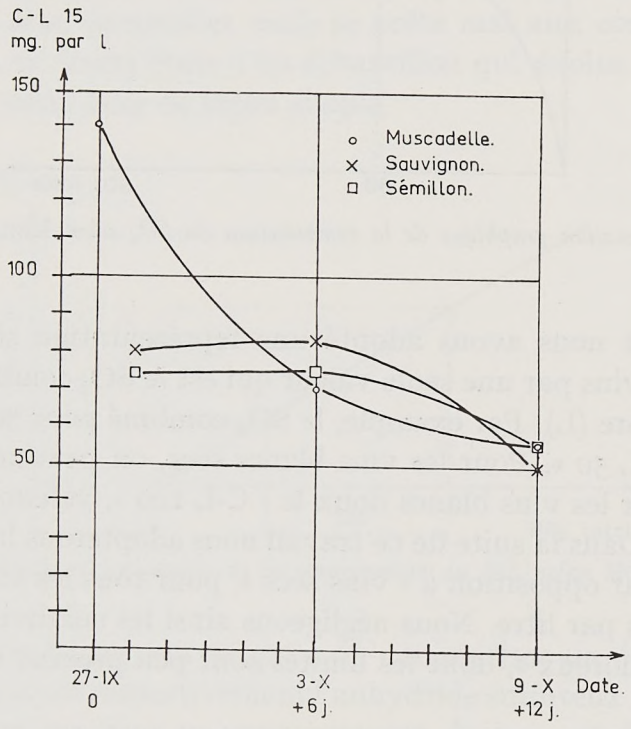


FIG. 5. — *Evolution du pouvoir de combinaison des vins (C-L 15) en fonction du degré de maturité de raisins sains.*

Raisins non triés. — Du 15 septembre au 22 octobre 1963 on effectue environ tous les huit jours un prélèvement de raisins, selon la technique de PEYNAUD, dans deux parcelles homogènes de *Sémillon*, et d'*Ugni* blanc (*Saint-Émilion des Charentes* ou *Trebiano*). Chaque lot de 1 à 2 kg est pressuré. On détermine le pouvoir de combinaison, caractérisé par le C-L 50, de chaque moût (fig. 6). Le phénomène se déroule ici exactement à l'inverse du cas précédent : le pouvoir de combinaison augmente sans cesse au cours de la maturation du raisin, atteignant la valeur très élevée de 430 mg de SO_2 combiné pour 50 mg de SO_2 libre à la maturité industrielle du *Sémillon*.

On retrouve le même classement en comparant les vins issus de ces moûts. L'inversion du phénomène n'est donc pas due à la fermentation.

En 1961, un essai similaire nous a fait constater une égale combinaison quelle que soit la date du ramassage, la vendange n'étant que légèrement pourrie pour les dernières récoltes (BLOUIN, 1962).

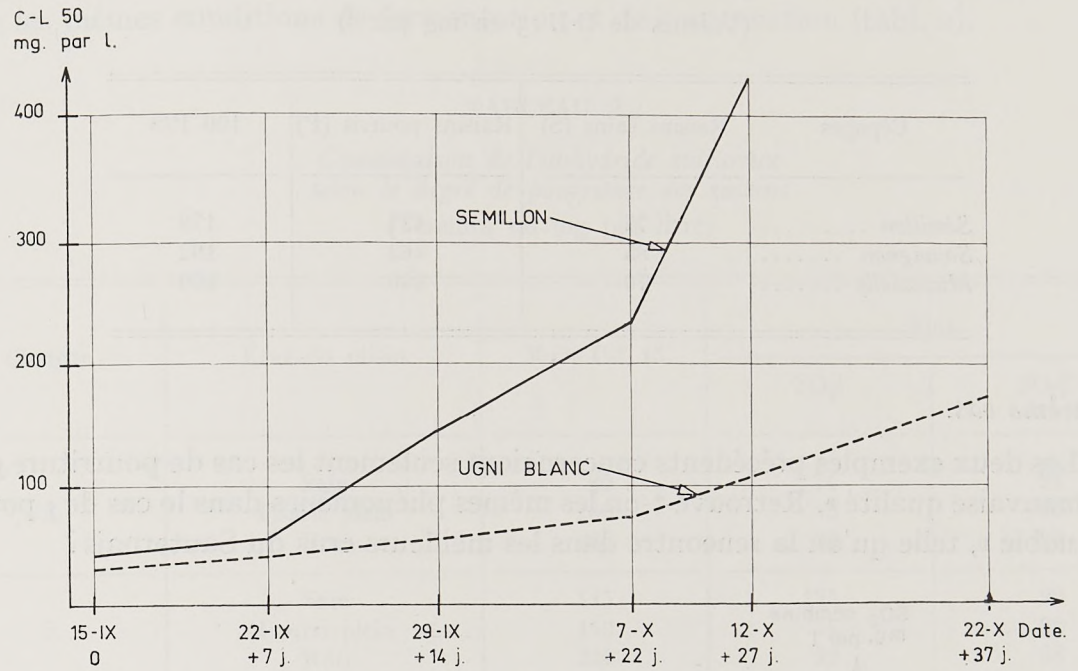


FIG. 6. — *Evolution du pouvoir de combinaison des moûts en fonction de la date de cueillette des raisins, en année humide, avec intervention de la pourriture.*

Ces résultats apparemment contradictoires sont explicables si l'on considère qu'il s'agit de situations différentes, c'est-à-dire de raisins parfaitement sains ou au contraire plus ou moins pourris, particulièrement dans le cas du *Sémillon* très sensible à cette maladie.

2. *Influence de l'état sanitaire du raisin*

C'est un fait d'expérience courante que les vins issus de raisins pourris « combinent » davantage. Nous avons précisé ce phénomène par plusieurs exemples.

Premier cas.

On compare les vins de trois cépages différents, issus d'une même cueillette, (3 octobre 1962), divisée grain par grain en deux lots : raisins sains et raisins pourris. Le tableau 1 indique les résultats obtenus. Ils montrent que, ici, la pourriture a doublé à peu près le pouvoir de combinaison.

Deuxième cas.

Une expérience comparable réalisée en 1963, récolte où la valeur moyenne du pouvoir de combinaison est la plus élevée que l'on ait connue, donne les résultats présentés sur la figure 7. Pour le maximum légal à l'époque de 450 mg par l de SO_2 total,

le moût issu de raisins pourris n'a que 17 mg par l de SO_2 libre ; il n'est pas nécessaire d'insister ici sur les graves inconvénients technologiques liés à une telle situation.

TABLEAU I

Influence de la pourriture du raisin sur le pouvoir de combinaison des vins obtenus

(Valeurs de C-L 15 en mg par l)

Cépages	Raisins sains (S)	Raisins pourris (P)	100 P/S
Sémillon	75	134	178
Sauvignon	85	163	192
Muscadelle	70	140	200

Troisième cas.

Les deux exemples précédents concernaient seulement les cas de pourriture grise de « mauvaise qualité ». Retrouve-t-on les mêmes phénomènes dans le cas de « pourriture noble », telle qu'on la rencontre dans les meilleurs crus du Sauternais ?

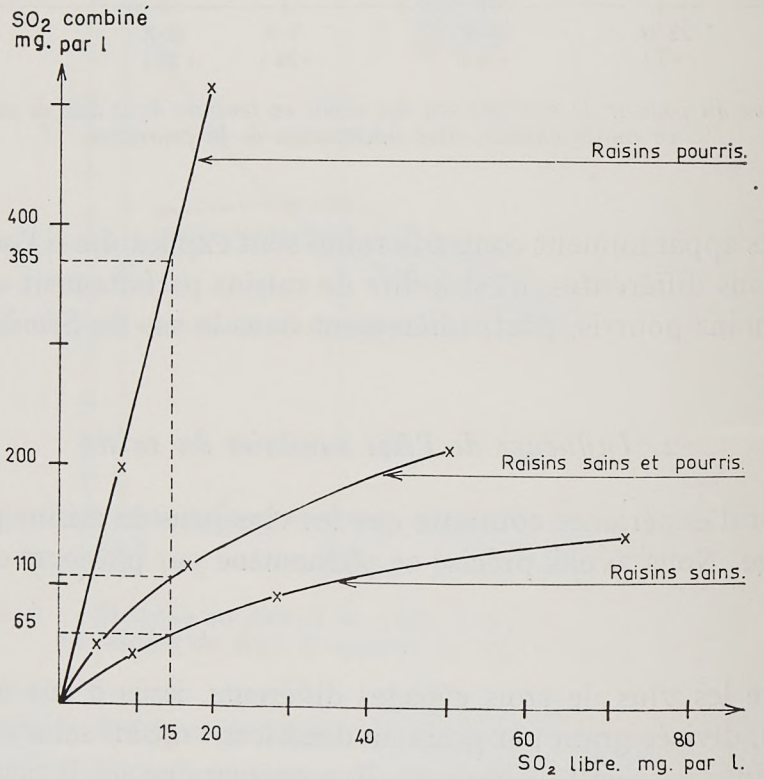


FIG. 7. — *Courbes de combinaison du moût selon l'état sanitaire des raisins* (Sémillon, 7 octobre 1963).

En 1962 nous avons récolté un lot de raisins dans trois « Premiers Crus » de Sauternes et Barsac (A, B, C) et nous avons divisé chaque lot en trois parties. Chacune, triée grain par grain, était constituée seulement soit de grains « sains », c'est-à-dire sans aucune trace de pourriture, soit de grains « pourris pleins », c'est-à-dire atteints

de pourriture noble mais sans conidiophores de *Botrytis cinerea* visibles, soit de grains « rôtis » où la pourriture atteint son maximum et qui correspondent au stade normal de cueillette dans le Sauternais. Dans tous les cas nous avons éliminé les rares grains atteints de pourriture vulgaire ou de moisissures diversement colorées.

Pour les neuf lots ainsi préparés, nous avons déterminé le C-L 15 du moût et comparé les équilibres SO_2 libre-SO_2 combiné pour les vins correspondants, obtenus dans les mêmes conditions de fermentation et de conservation (tabl. 2).

TABLEAU 2

Combinaison de l'anhydride sulfureux selon le degré de pourriture des raisins
(Teneurs en mg par litre)

Château	État du raisin	Moût C-L 15	Vins	
			SO_2l	SO_2C
A	Sain	80	74	92
	Pourri plein	260	45	90
	Rôti	280	22	92
B	Sain	115	124	90
	Pourri plein	140	74	92
	Rôti	220	22	88
C	Sain	100	118	98
	Pourri plein	260	16	102
	Rôti	270	13	100

Ici encore on constate que le développement de la pourriture, même de la « pourriture noble », augmente très fortement le pouvoir de combinaison des moûts et des vins.

Déjà en 1960, S. LAFON-LAFOURCADE dans des déterminations inédites avait observé l'action de la pourriture des raisins sur le pouvoir de combinaison des moûts. Pour vingt et un moûts issus de raisins rouges du Médoc et de Saint-Émilion, peu ou pas pourris, cet auteur a trouvé un C-L 150 allant de 150 à 200 mg par litre (moyenne 176 mg), alors que pour sept moûts issus de raisins pourris de grands crus du Sauternais, elle a trouvé un C-L 100 de 155 à 420 mg par litre (moyenne 230 mg), soit une combinaison double ou triple.

Sans qu'il soit nécessaire de donner encore de nombreux exemples, nous voyons nettement que le développement de pourriture grise ou de pourriture noble augmente considérablement le pouvoir de combinaison des moûts. Le problème des combinaisons anormales n'est donc pas seulement un problème de conduite de la fermentation ou de traitement des vins, mais surtout un problème de cueillette et d'état sanitaire de la matière première : c'est d'abord un problème viticole.

Il est important pour l'œnologue de rechercher les causes précises de ces modifications du raisin et de caractériser la microflore responsable.

3. *Modification du pouvoir de combinaison des moûts après cultures de microorganismes*

La flore microbienne des raisins pourris est assez mal connue. On cite toujours la présence de *Botrytis cinerea* et celle plus ou moins fréquente de moisissures variées : *Rhizopus, Aspergillus, Sterigmatocystis nigra, Penicillium,* qui provoquent suivant les situations écologiques rencontrées, les pourritures dites « noble », « vulgaire », « grise », « noire », « putride », « acide », « verte ». En outre, on a souvent signalé la présence de bactéries, les bactéries acétiques étant particulièrement abondantes sur les raisins attaqués par les vers de la grappe et les drosophiles. On sait d'autre part que de nombreuses bactéries acétiques ont un important pouvoir cétogène (Dupuy, 1957).

Afin de préciser leur influence sur le pouvoir de combinaison des moûts, nous avons cultivé diverses souches de bactéries acétiques et de moisissures sur moûts de raisins. Les bactéries acétiques nous ont été fournies par J. G. Carr de la Station de Recherches de Long Ashton (souches *CR 86, BN 5, 2-63-5,* d'*Acetomonas oxydans* isolées du cidre) ; qu'il en soit remercié ici. Nous avons isolé les différentes souches de moisissures à partir de dix-huit prélèvements de raisins pourris effectués dans divers vignobles du Bordelais en utilisant les techniques de culture et de repiquage décrites par Charpentié (1954).

Influence des bactéries acétiques sur le pouvoir de combinaison des moûts.

On ensemence aseptiquement 350 ml de moût de raisin contenus dans un erlenmeyer d'un litre par quelques fragments d'une première culture obtenue sur milieu solide à base de gélose (2 p. 100) et de carbonate de calcium (2 p. 100). Après le temps choisi de développement à 25°C en aérobiose (les erlenmeyers sont bouchés par un tampon de ouate), on détermine le pouvoir de combinaison du milieu de culture privé de bactéries par centrifugation et filtration.

Dans un premier essai, après quatre jours de développement des bactéries on a obtenu les résultats suivants (tabl. 3).

TABLEAU 3

Modification du moût sous l'influence des bactéries acétiques

(Durée de développement 4 jours à 25°C ; teneurs par litre)

	Sucres consommés (g)	C-L 15 (mg)	Acidité fixe (méq.)	Acidité volatile (méq.)	Acétate d'éthyle (mg)
Témoin	0	53	125	3	0
Souche *CR 86*	60	450	336	68	374
Souche *BN 5*	57	132	310	40	134
Souche *2-63-5*	23	190	166	14	29

On observe une modification profonde de la composition du moût avec des variations apparemment indépendantes du pouvoir de combinaison et de l'acidité volatile. Ainsi la souche *2-63-5* quadruple presque le pouvoir de combinaison avec de faibles formations d'acidité volatile et d'acétate d'éthyle ; le milieu de culture de la souche *2-63-5* présente des caractères analytiques comparables à ceux de certains moûts naturels issus de raisins pourris. L'augmentation de l'acidité fixe est parfois considérable.

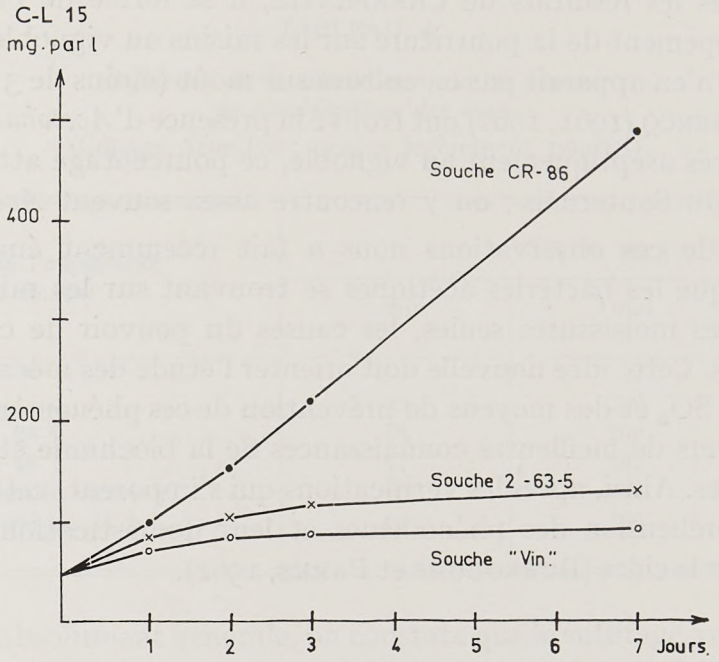


FIG. 8. — *Evolution du pouvoir de combinaison d'un moût en fonction de la durée de développement de différentes souches de bactéries acétiques.*
(La souche « Vin » a été isolée d'un vin piqué).

Au cours d'un autre essai conduit comme précédemment nous avons suivi les variations de la composition du milieu de culture en fonction du temps par analyses au bout de 1, 2, 3 et 7 jours. La figure 8 indique les résultats obtenus et montre les différences de comportement des souches. L'augmentation du pouvoir de combinaison du moût est liée à l'ensemencement initial, à la nature de la souche et aux conditions de milieu (température, acidité, teneur en sucres et sans doute en facteurs de croissance).

Influence des moisissures sur le pouvoir de combinaison des moûts.

Nous avons ensemencé aseptiquement des moûts stériles par diverses cultures de moisissures non caractérisées, isolées de raisins de différentes origines. A défaut d'identification botanique précise, nous pouvons dire qu'il y avait certainement des souches de *Botrytis cinerea* et d'*Aspergillus niger*, ainsi que diverses autres espèces à mycélium coloré.

Nous avons ainsi constaté un sensible accroissement du pouvoir de combinaison du moût, le C-L 15 allant environ de 70 à 150 mg par l. Dans aucun cas cependant nous n'avons approché des résultats obtenus après développement de bactéries acétiques qui semblent donc avoir le rôle prépondérant.

Comparaison des effets des bactéries acétiques et des moisissures.

Le développement de la pourriture au vignoble entraine un très fort accroissement de la combinaison du SO_2 dans les moûts, ainsi qu'une formation sensible d'acidité volatile. Les cultures pures sur moûts de raisin montrent que les bactéries acétiques cumulent ces deux propriétés, alors que les moisissures ne forment pas d'acidité volatile et qu'elles élèvent moins fortement le taux de combinaison que les bactéries. D'après les résultats de CHARPENTIÉ, il se forme de l'acide acétique au cours du développement de la pourriture sur les raisins au vignoble (jusqu'à 12 méq. par l), alors qu'il n'en apparaît pas en culture sur moût (moins de 3 méq. par l). Enfin PEYNAUD et DOMERCQ (1961, 1962) ont trouvé la présence d'*Acetobacter* dans 45 p. 100 des raisins prélevés aseptiquement au vignoble, ce pourcentage atteignant 65 p. 100 pour les raisins du Sauternais ; on y rencontre assez souvent *Acetobacter xylinum.*

L'ensemble de ces observations nous a fait récemment émettre l'hypothèse (BLOUIN, 1964) que les bactéries acétiques se trouvant sur les raisins pourris sont, davantage que les moisissures seules, les causes du pouvoir de combinaison élevé de certains moûts. Cette idée nouvelle doit orienter l'étude des mécanismes chimiques de la fixation du SO_2 et des moyens de prévention de ces phénomènes technologiquement redoutés, vers de meilleures connaissances de la biochimie et de l'écologie des bactéries acétiques. Ainsi, après les vérifications qui s'imposent, cette hypothèse doit faciliter la compréhension des phénomènes et leur domestication comme cela est déjà en cours pour le cidre (BURROUGHS et PARKS, 1962).

III — Influence des conditions de vinification sur le pouvoir de combinaison des vins

Après avoir étudié les « facteurs viticoles » de la combinaison du SO_2, c'est-à-dire concernant la composition et l'état de la matière première, nous examinerons les facteurs se rapportant aux techniques de vinification.

1. *Influence de la macération des parties solides*

On sait que la macération des rafles, des pellicules et des pépins dans le moût avant fermentation est très préjudiciable à la qualité des vins blancs qui sont alors plus durs, plus amers, plus oxydés. Nous avons pu vérifier en 1961 que cette macération augmentait également le pouvoir de combinaison des vins ainsi élaborés. Le tableau 4 résume les conditions de l'essai et ses résultats.

On voit l'importante augmentation de la combinaison de SO_2 après macération des rafles et surtout des pellicules, même en 1961 où la combinaison du SO_2 fut relativement faible en Bordelais. CASSIGNARD (1964) a signalé les mêmes phénomènes et il serait facile d'accumuler d'autres exemples identiques.

Dans tous les cas la macération des parties solides dans le moût, avant ou pendant la fermentation, accroît sensiblement le pouvoir de combinaison des vins blancs ; c'est une raison supplémentaire de proscrire cette pratique.

2. *Influence du sulfitage avant fermentation.*

On connaît les effets bénéfiques du sulfitage avant fermentation, en particulier sur les qualités organoleptiques des vins blancs secs ainsi que sur leur résistance ultérieure à l'oxydation et de même on sulfite souvent légèrement les moûts destinés à la production de vins blancs doux. Quelles sont les incidences de cette pratique sur le pouvoir de combinaison des vins ainsi obtenus ?

TABLEAU 4

Influence de la macération sur le pouvoir de combinaison des vins

(Cépage *Sémillon* ; raisins légèrement pourris)

Conditions de l'expérience (raisins foulés)	SO_2 en mg par l		
	Libre	Total	Combiné
Pressurage immédiat	99	202	112
Pressurage retardé de 24 h	49	200	151
Pressurage retardé de 48 h	47	202	153
Éraflage-Pressurage retardé de 24 h	66	202	136
Rafles-Pressurage retardé de 24 h	60	200	140

D'une façon absolument générale, on constate que le sulfitage avant fermentation augmente nettement le pouvoir de combinaison. PEYNAUD et S. LAFON-LAFOURCADE (1952) ont montré qu'il y avait formation accrue d'éthanal mais on peut constater (tabl. 5) qu'il y a également augmentation du SO_2 résiduel, c'est-à-dire de la fraction qui n'est combinée ni à l'éthanal ni aux sucres.

TABLEAU 5

Exemples de modifications du pouvoir de combinaison des vins sous l'influence du sulfitage du moût

(SO_2 en mg par litre)

	Sulfitage	Type de vin	C-L 50	R-L 50
Moût n° 1	0	sec	65	43
	50	sec	115	81
	100	sec	175	72
Moût n° 2	0	sec	65	13
	30	sec	135	90
Moût n° 3	0	doux	330	230
	100	doux	380	310
Moût n° 4	0	doux	255	145
	100	doux	335	240

L'augmentation de la combinaison n'est pas directement en rapport avec l'importance du sulfitage, au moins au-dessus d'une certaine valeur. D'un autre côté le moment précis du sulfitage du moût est un facteur primordial, mais le meilleur moment est à peu près incontrôlable. En effet le sulfitage « avant fermentation » a parfois lieu après un léger développement de levures. Un même sulfitage à 100 mg par l, réalisé immédiatement après le foulage ou après 4, 21 ou 48 heures, a donné des vins ayant un R-L 50 de respectivement 78, 40, 78 et 56 mg par l, soit une variation irrégulière de 1 à 2. Par ailleurs on sait qu'un sulfitage retardé augmente la formation d'éthanal et qu'en outre il est moins efficace vis-à-vis de l'oxydation du moût et du contrôle de la flore microbienne. Il est donc nécessaire de sulfiter le moût au fur et à mesure de sa séparation des grains par foulage ou pressurage.

3. *Influence de la clarification du moût avant fermentation.*

Généralement une bonne vinification en blanc sec demande un débourbage par soutirage après sulfitage ou par centrifugation et ces techniques s'utilisent aussi en vinification en blanc doux. Nous avons comparé à plusieurs reprises ces deux techniques, sans pouvoir conclure sur leurs effets vis-à-vis de la combinaison du SO_2, les résultats étant variables selon les essais. Nous n'avons cependant jamais rencontré de cas de fixation anormale de SO_2 favorisée par ces pratiques et par conséquent elles restent utilisables les nombreuses fois où elles peuvent améliorer la qualité des vins.

4. *Influence du sucrage du moût*

On invoque souvent un enrichissement important par sucrage comme un facteur favorisant une forte combinaison. En 1961 nous avons enrichi un moût du cépage *Ugni blanc* de raisins très sains de 9° en puissance, en l'amenant respectivement

TABLEAU 6

Influence de l'enrichissement du moût par sucrage sur le pouvoir de combinaison des vins

Élévation de degrés	SO_2 en mg par l		
	libre	combiné	résiduel
0°	218	100	73
+ 2°	198	110	75
+ 4°	189	106	68
+ 6°	152	96	61
+ 8°	121	95	57

à 11°, 13°, 15° et 17° en puissance ; les différents vins ainsi obtenus furent mutés alors qu'ils conservaient de 25 à 45 g de sucre par l. Le tableau 6 indique les résultats obtenus. On voit que pour une teneur à peu près constante en SO_2 combiné ou résiduel, la teneur en SO_2 libre des vins obtenus décroit rapidement lorsque l'enrichissement

en sucre augmente. On constate de même que le pouvoir de combinaison est d'autant plus élevé que le degré alcoolique acquis est plus grand.

De même un moût de 9°5 issu de raisins *Sémillon* très pourris et enrichis de 4°, puis mis à fermenter avec ou sans sulfitage, a donné des vins accusant une valeur de C-L 15 supérieure de 30 à 35 p. 100 à celle du vin non enrichi (tabl. 7).

TABLEAU 7

Valeur du C-L 15 des vins en fonction du sucrage et du sulfitage des moûts

(Teneurs en mg par litre)

	Sans sulfitage du moût	Avec sulfitage du moût (50 mg par l)
Moût non sucré	210	248
Moût sucré de 4°	292	320

Ainsi dans les cas de sucrages abusifs, on observe une sensible augmentation du pouvoir de combinaison des vins obtenus. Cette augmentation est liée à la formation de substances de fermentation à fonction cétonique et non à un effet propre du saccharose ajouté ; ce corps ne fixe d'ailleurs pratiquement pas de SO_2 (cf. plus loin p. 256). Nous avons obtenu les mêmes résultats en le remplaçant par la quantité équivalente du mélange glucose + fructose.

Dans aucun cas cependant cette action ne saurait être importante pour un vin enrichi conformément à la législation, même dans les cas de sucrage en fin de fermentation alcoolique, car le moment du sucrage ne modifie pas le résultat final.

IV — Influence de la fermentation alcoolique sur l'évolution du pouvoir de combinaison des moûts

Nous avons vu que le vin fixe plus ou moins d'anhydride sulfureux selon les traitements subis par le moût. D'une façon plus générale quels rapports existe-t-il entre le pouvoir de combinaison du moût et du vin correspondant ?

1. *Comparaison globale du pouvoir de combinaison des moûts et des vins*

L'étude comparée des nombreux moûts et vins correspondants nous montre que dans plus de 95 p. 100 des cas, il y a une nette augmentation du pouvoir de combinaison en passant du moût au vin. Cette augmentation, mesurée par le rapport des C-L 15 ou C-L 50, dans les deux cas, va de 15 à 300 p. 100 avec une moyenne de 140 p. 100, pour un grand nombre de déterminations. Elle montre que la fermentation est une source importante de substances fixatrices de l'anhydride sulfureux.

Cette augmentation est irrégulière et il paraît difficile de prévoir la combinaison du SO_2 d'un vin connaissant celle du moût originel. On peut simplement dire qu'elle sera plus forte.

2. *Évolution du pouvoir de combinaison au cours de la fermentation alcoolique*

Connaissant la complexité des mécanismes chimiques de la fermentation alcoolique, on doit penser que le pouvoir de combinaison varie beaucoup au cours de ce phénomène. Afin de préciser cette variation, nous avons mesuré le pouvoir de combinaison, tout au long de la fermentation d'un même moût, fermentant en bouteilles à 25°C dans trois conditions différentes : aérobiose ménagée (bouchage ouate), anaérobiose (bouchage par barboteur à eau) et aérobiose avec sulfitage du moût à 50 mg par l.

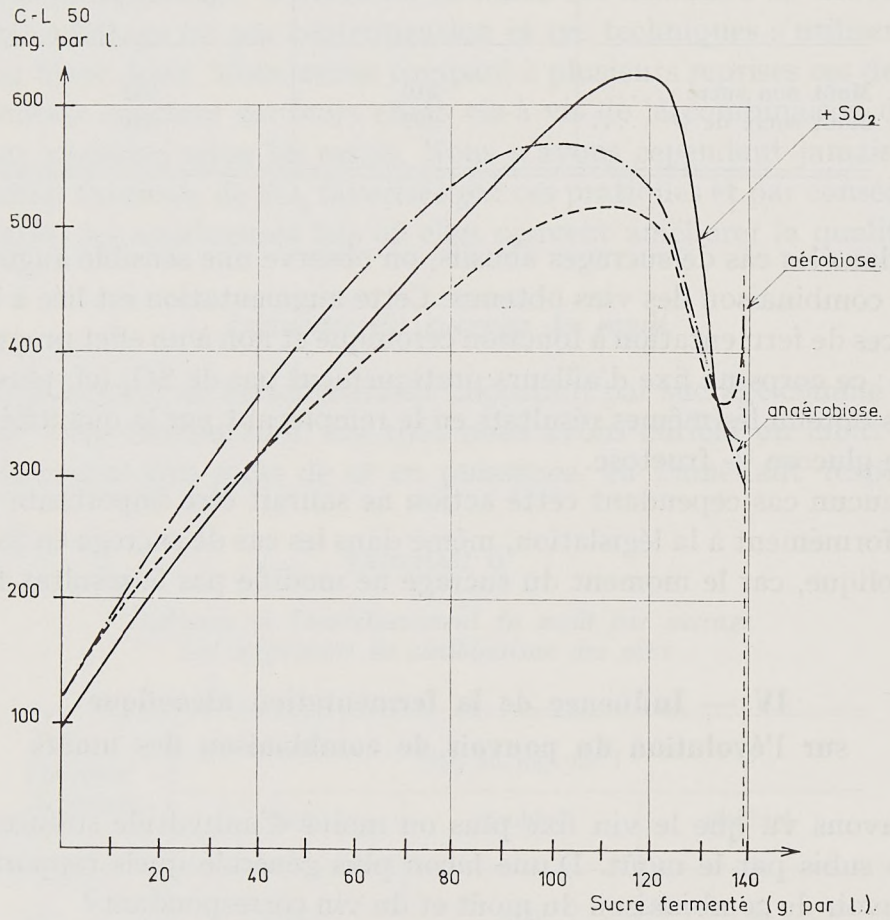


FIG. 9. — *Evolution du pouvoir de combinaison au cours de la fermentation alcoolique d'un moût, en fonction du sucre fermenté*

Les résultats sont indiqués sur la figure 9 représentant les variations du pouvoir de combinaison en fonction du sucre fermenté. Ces courbes appellent peu de commentaires. On constate dans une première phase une forte augmentation progressive du pouvoir de combinaison qui est multiplié par 5 ou 6, suivie d'une diminution dans les cas d'anaérobiose et de sulfitage, tandis qu'en aérobiose l'augmentation s'accentue alors qu'il ne reste plus de sucre fermentescible. Cette augmentation est liée à des phénomènes d'oxydation en présence de levures et ne se manifesterait pas dans le

cas de la vinification normale en évitant le contact de l'air et avec le sulfitage habituel en fin de fermentation alcoolique.

Sans vouloir généraliser à partir de ces exemples, et d'autres observés plus succinctement dans les conditions habituelles de vinification, on peut conclure que le pouvoir de combinaison est très variable au cours de la fermentation alcoolique proprement dite, et dépend également du mode de conservation du vin jusqu'au moment du sulfitage. Le moment et la technique du mutage sont donc déterminants pour fixer le pouvoir de combinaison d'un vin doux. Cette idée est plus ou moins connue des praticiens, mais elle est rarement exploitée. Il nous apparaît extrêmement important de la dégager, elle permettra d'apporter d'appréciables améliorations aux techniques actuelles de mutage.

V — Influence des conditions de mutage sur le pouvoir de combinaison des vins blancs

Cette question très importante imposait les nombreux essais sur des vins différents. Nous donnons ici les principaux résultats de notre expérimentation.

On sait déjà que la combinaison du SO_2 est augmentée par un mutage en présence de nombreuses levures vivantes, particulièrement de certaines espèces (*Saccharomyces oviformis*). La règle essentielle d'un bon mutage est d'éliminer d'abord le maximum de levures, par soutirage ou autre moyen de séparation. Sa stricte application ne suffit pas toujours cependant pour obtenir des vins blancs doux stables ; nous avons essayé de la coupler avec d'autres techniques.

A la récolte 1961, nous avons comparé quarante-deux conditions différentes de mutage, appliquées à un même vin de Barsac combinant, il est vrai, très peu de SO_2 (*C-L* 50 = 100). Nous n'avons pu déceler aucune technique diminuant sensiblement le pouvoir de combinaison caractérisé par la teneur en SO_2 résiduel, qu'il s'agisse du traitement par le froid ou la chaleur, du collage à la bentonite, de la filtration stérilisante, ou de l'addition d'antiseptiques tels que l'acide sorbique, le captane, la mycostatine ou le pyrocarbonate d'éthyle ou autre antibiotique antifongique. On ne peut donc, en dehors de l'application des règles déjà connues concernant le nombre, l'espèce et l'activité des levures, réduire notablement la combinaison du SO_2 dans les vins doux lors de leur mutage. Par contre, et c'est technologiquement très important, on peut accroître leur résistance à la refermentation. Outre le mutage couplé à une addition d'antiseptique comme l'acide sorbique, nous avons obtenu de bons résultats en mutant au SO_2 des vins préalablement chauffés à 35°-40°, afin de provoquer des arrêts de fermentation. Cette technique simple contribue à résoudre avec succès de difficiles problèmes de conservation de vins combinant fortement l'anhydride sulfureux.

D'un autre côté nous avons amélioré directement le taux de combinaison dans les vins en les traitant sur résines échangeuses d'anions. Les résultats de ce procédé, actuellement interdit en France, méritent d'être décrits ici à cause de leur grand intérêt potentiel.

Un vin blanc de 11° en puissance est muté, alors qu'il a 9° d'alcool acquis, comparativement par sulfitage classique et par traitement à l'aide de diverses résines échangeuses d'anions. Nous avons utilisé les résines Lewatit MP 500, MP 60, M 500 et MI

sur lesquelles on a fait passer au préalable vingt volumes d'une solution à 10 p. 100 de bisulfite de sodium, puis de l'eau distillée jusqu'à élimination des sulfites dans l'éluat. On ajoute ensuite 10 ml de ces résines sous forme HSO_3^- et SO_3^{--} (selon leur pH) par litre de vin à muter ; on agite manuellement à diverses reprises ; on décante la résine et on titre le SO_2 libre et combiné après 4 jours. Le tableau 8 reproduit les résultats trouvés : pour une teneur en SO_2 combiné assez constante, on constate une importante variation du SO_2 libre et, sauf pour MP 500, le mutage est mieux réussi par traitement aux résines sous forme sulfite et bisulfite, surtout pour MI, que par l'anhydride sulfureux apporté directement. Cette possibilité nouvelle, à notre connaissance jamais encore signalée, doit ouvrir le champ à d'appréciables progrès techniques.

TABLEAU 8

Mutages effectués à l'aide d'échangeurs d'anions

(Teneurs en mg par litre)

Mutage effectué avec	SO_2l	SO_2C
SO_2	70	250
Lewatit MP 500	53	210
Lewatit M 500	78	225
Lewatit MP 60	90	240
Lewatit MI	124	285

VI — Mécanismes de la combinaison de l'anhydride sulfureux dans les moûts et les vins

La mise en évidence de quantités importantes de « SO_2 combiné résiduel » pose immédiatement le problème de la nature de ces combinaisons. On a invoqué en particulier le rôle des colloïdes apparaissant dans les raisins pourris, des réactions de Maillard entre acides aminés et sucres, des produits d'oxydation de l'acide tartrique et, de façon plus générale, des composés à fonction carbonyle, la réaction SO_2^- fonction carbonyle étant une des plus caractéristiques de la chimie de l'anhydride sulfureux et se manifestant déjà dans les moûts et vins dans les combinaisons éthanal—SO_2 et sucres—SO_2.

1. *Rôle des substances colloïdales*

Les vins provenant de raisins pourris sont riches en colloïdes protecteurs et se clarifient mal ; on a pensé que les substances colloïdales gênant la clarification pouvaient fixer également l'anhydride sulfureux.

L'emploi de nombreux collages minéraux ou organiques, de la filtration, de traitements aux enzymes pectolytiques, du chauffage et de la réfrigération permet de clarifier ces vins, mais ne modifie pas leur pouvoir de combinaison. Fixation élevée

de SO_2 et mauvaise clarification peuvent avoir une même cause (la pourriture des raisins) mais leurs mécanismes sont différents et donc leurs remèdes le sont aussi. Le dextrane et autres mucilages du *Botrytis cinerea* ne fixent pas d'anhydride sulfureux.

2. *Rôle des réactions de Maillard*

Les complexes « réactions de Maillard » entre les sucres et les acides aminés font apparaître divers composés intermédiaires à fonction carbonyle avant la formation de mélanoïdines. Cette réaction, intense à chaud, serait également possible à température ordinaire. Il ne semble pas cependant qu'elle joue un rôle appréciable dans les vins, car une solution de glucose ou de fructose ne fixe pas plus de SO_2 en présence de quantités importantes d'acides aminés qu'en leur absence et les concentrations des moûts et des vins en acides aminés sont faibles.

3. *Rôle des transformations de l'acide tartrique*

L'acide tartrique peut se transformer en divers composés carbonyliques, comme l'ont montré Genevois et Gay, puis Baraud (1954) et Rodopoulo, l'ensemble des travaux sur ce sujet ayant été passés en revue par Deibner (1956) et Dupuy (1960).

TABLEAU 9

Fixation du SO_2 par des solutions d'acide tartrique sucrées abandonnées 25 jours à l'air en présence de catalyseurs métalliques à pH 3,3

(Teneurs de SO_2 en mg par litre. Fer : 20 mg. Cuivre : 2 mg par litre)

		SO_2 total	SO_2 libre	SO_2 combiné
Acide tartrique seul	sans métaux	200	197	3
	avec métaux	160	118	42
Acide tartrique + glucose	sans métaux	201	176	25
	avec métaux	155	0	155
Acide tartrique + fructose	sans métaux	202	198	4
	avec métaux	175	0	175
Ac. tartrique + arabinose	sans métaux	202	180	22
	avec métaux	175	0	175

Nous avons préparé des solutions d'acide tartrique N/10 amenées à pH 3,3 par neutralisation à la soude, avec ou sans addition de cuivre Cu^{++} (2 mg par l) et de fer Fe^{+++} (20 mg par l) et additionnées de glucose (100 mMol par l), de fructose (100 mMol par l) ou d'arabinose (5 mMol par l). Le tableau 9 donne un exemple des taux de combinaison obtenus avec de telles solutions et par addition de 200 mg de SO_2 par l, 25 jours après leur préparation.

On peut dégager les conclusions suivantes. En l'absence de fer et de cuivre, les solutions d'acide tartrique ne fixent pratiquement pas de SO_2 et les solutions de sucre

ne fixent que les quantités prévues. En présence de fer et de cuivre, les solutions d'acide tartrique fixent une certaine quantité de SO_2 et les solutions contenant un sucre en fixent beaucoup plus. Cette action d'un sucre n'avait jamais été signalée, à notre connaissance, et pourrait cependant jouer un rôle important dans les milieux naturels. On note en même temps une diminution du SO_2 total et une formation de sulfates ; le fer, le cuivre et sans doute les produits d'oxydation apparus catalysent l'oxydation du SO_2.

Nous avons toujours constaté la présence abondante d'acide glyoxylique dans ces solutions oxydées. Par chromatographie sur papier de sa dinitrophénylhydrazone et par dosage colorimétrique, nous avons caractérisé et dosé jusqu'à 500 mg par l de cet acide.

A priori ces phénomènes d'oxydation de l'acide tartrique semblent pouvoir être importants dans les moûts et les vins. En fait nous verrons qu'il n'en est rien car le vin est riche en substances beaucoup plus oxydables que l'acide tartrique. Celui-ci se trouve ainsi protégé, même dans les vins oxydés du type Jerez, Banyuls, Porto.

4. *Rôle des corps à fonction carbonyle*

Si le SO_2 est fixé par les corps à fonction carbonyle, l'addition d'un excès de réactif de cette fonction doit libérer du SO_2. C'est effectivement ce que l'on constate par addition d'hydroxylamine et de divers autres réactifs de la fonction carbonyle (hydrazine substituée, carbazide substituée, phénylène diamine...).

Le grand intérêt de cette constatation simple est de confirmer de façon très nette que les principaux responsables de la combinaison du SO_2 sont des corps à fonction carbonyle. Dans la suite de notre travail, nous étudierons systématiquement la réaction carbonyle-SO_2 en solution simple, nous rechercherons et déterminerons les composés carbonylés susceptibles de se trouver dans les moûts et les vins.

Conclusions

En conclusion de ce chapitre sur les combinaisons globales de l'anhydride sulfureux, il nous paraît nécessaire d'en reprendre quelques idées importantes et nouvelles et d'en dégager l'intérêt théorique et pratique.

En premier lieu, nous avons montré qu'il était à la fois pratique et exact de caractériser la combinaison de l'anhydride sulfureux par une seule valeur, déterminée par l'expérience et le calcul, par exemple l'indice C-L 50 représentant le SO_2 combiné pour 50 mg de SO_2 libre par litre et l'indice R-L 50 représentant le SO_2 résiduel pour 50 mg de SO_2 libre par litre. Ces indices permettent de comparer plusieurs vins différents et de suivre l'évolution d'un même vin. Ils remplacent pratiquement les courbes de combinaison du SO_2 et sont plus significatifs que les valeurs instantanées du SO_2 libre et total habituellement portées sur le bulletin d'analyse. Le C-L 50 exprime de manière simple et précise l'équilibre du SO_2 dans un milieu.

D'un autre côté sur un plan pratique nous avons constaté que le pouvoir de combinaison du moût vis-à-vis de l'anhydride sulfureux décroît au cours de la maturation de raisins sains et croît fortement dans le cas de développement de pourriture. Ce dernier facteur est déterminant. Plus que les moisissures, ce sont vraisemblable-

ment les bactéries acétiques présentes sur le raisin pourri qui provoquent l'augmentation du pouvoir de combinaison du moût par les substances carbonyliques formées.

Cette idée nouvelle doit orienter les études de la microflore des raisins et les essais au vignoble de lutte contre la pourriture et les drosophiles, ces dangereux vecteurs des bactéries acétiques. D'ores et déjà cela confirme qu'il est important de récolter des raisins aussi sains que possible : les vins seront plus fruités et moins oxydables mais aussi combineront moins l'anhydride sulfureux et seront plus faciles à conserver. La pourriture « noble », nécessaire à l'élaboration d'un petit nombre de vins doux doit être réservée à des cas particuliers et évitée partout ailleurs où elle évolue trop facilement vers la pourriture « grise ».

Au cours de la vinification on peut réduire le pouvoir de combinaison des vins blancs en évitant toute macération des rafles et pellicules dans la vendange prématurément foulée et en réduisant, si possible, le sulfitage avant fermentation. Le pouvoir de combinaison variant très fortement au cours de la fermentation, le meilleur moment du mutage des vins blancs doux est encore bien difficile à préciser. En dehors des exigences déjà connues, on ne peut préconiser de nouvelles règles de mutage. Sur le plan théorique le mutage d'un vin par passage sur échangeurs d'anions chargés d'ions sulfites et bisulfites permet une diminution de son pouvoir de combinaison. Cette technique mérite de nouvelles études d'application.

Enfin nous avons vérifié que par addition de réactifs de la fonction carbonyle, on obtenait une libération partielle de l'anhydride sulfureux combiné.

Connaissant maintenant les combinaisons de l'anhydride sulfureux, leurs variations et leurs mécanismes sous leur aspect global, nous pouvons en entreprendre leur étude détaillée et analytique dans les chapitres qui suivent.

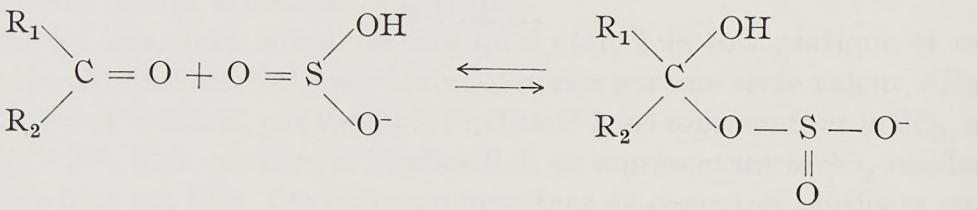
CHAPITRE II

ÉTUDE DE LA COMBINAISON DE L'ANHYDRIDE SULFUREUX PAR DIFFÉRENTES SUBSTANCES

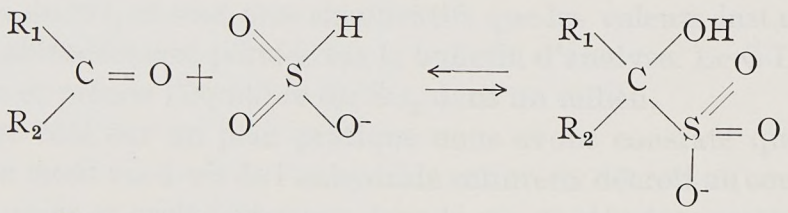
On sait que l'anhydride sulfureux en solution peut réagir avec de nombreuses substances pour donner des composés stables ou des complexes plus ou moins labiles. Ces propriétés sont signalées dans les traités de chimie et dans les ouvrages spécialisés de chimie alimentaire (PAUL, 1914 ; JOSLYN, 1952 ; JOSLYN et BRAVERMAN, 1954 ; GEHMAN et OSMAN, 1954). Outre l'autocondensation en métabisulfite et la formation d'hydrate, on a signalé des réactions avec l'ammoniaque, l'hydrazine, les amines, les alcaloïdes, les sels d'acides gras aromatiques, le méthanol, l'éther, les polyphénols, les protéines et leurs dérivés et plus généralement avec les corps non saturés. Cependant la réaction d'addition la plus importante a lieu avec la fonction carbonyle dont c'est une propriété caractéristique connue depuis au moins 1848. Cette réaction nous servira d'exemple dans l'étude générale des composés d'addition de l'anhydride sulfureux.

I — Chimie des combinaisons d'addition de l'anhydride sulfureux

On propose habituellement deux équations pour la réaction entre anhydride sulfureux et fonction carbonyle, correspondant aux deux structures possibles de l'acide sulfureux (cf. Introduction), la structure dissymétrique représentant 88 p. 100 du total dans le cas du sulfite de sodium, d'après GERMAIN et CONDUCHÉ (1932).



acide α. hydroxysulfonique

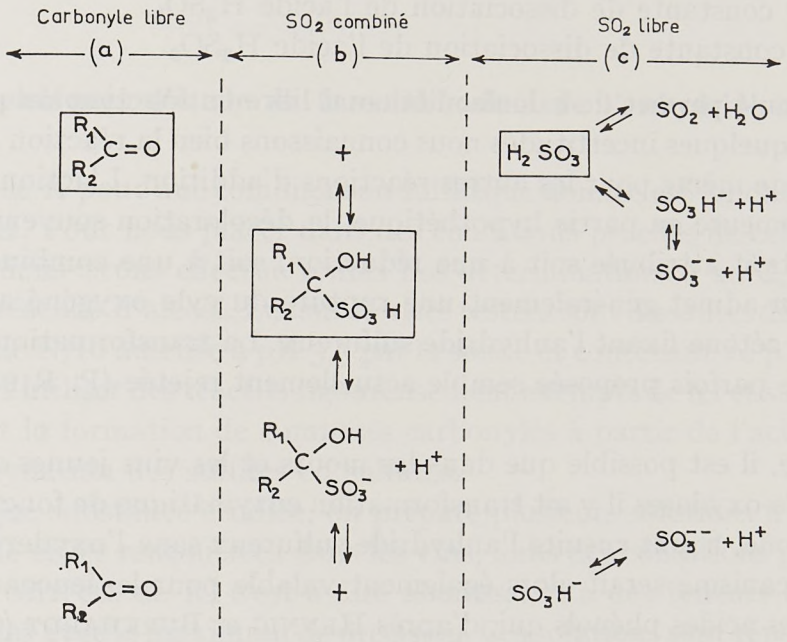


Formule de KERP

ester sulfureux
de l'hydrate d'aldéhyde

Les deux structures proposées expliquent des propriétés différentes du composé d'addition obtenu. Une troisième structure proposée pour les combinaisons avec les sucres et respectant la double liaison C=O semble devoir être rejetée.

Les solutions sulfureuses de composés carbonylés sont donc des mélanges complexes dont les proportions des différents constituants varient, suivant la loi d'action de masse, avec les concentrations en anhydride sulfureux, en composés carbonylés et en ions H^+. Cependant, le plus souvent, on n'utilise qu'une représentation globale des réactions reliant les concentrations molaires totales des trois colonnes *a*, *b*, *c*, du schéma ci-dessous, d'après PAUL (1914) :



On a alors la constante de dissociation :

$$K = \frac{[c] \times [a]}{[b]},$$

ou en explicitant :

$$K = \frac{[SO_2 + H_2SO_3 + HSO_3^- + SO_3^{--}] \times \left[\begin{matrix}R_1\\R_2\end{matrix}\!\!>\!C = O\right]}{\left[\begin{matrix}R_1\\R_2\end{matrix}\!\!>\!COH - SO_3H + \begin{matrix}R_1\\R_2\end{matrix}\!\!>\!COH - SO_3^-\right]}$$

En simplifiant nous avons la formule usuelle :

$$\boxed{K = \frac{[l] \times [A - C]}{[C]}}$$

où l = concentration molaire en SO_2 libre,
A = concentration molaire en composé carbonylé total,
C = concentration molaire en SO_2 combiné.

Nota : dans les vins les formes SO_2 et SO_3^{--} n'existent pas.

Remarquons que les valeurs trouvées de K s'écrivent alors $K = xM$, x étant la valeur numérique trouvée et M étant l'abréviation de mole.

On peut également calculer la dissociation réelle du composé d'addition en fonction du pH du milieu et de K. D'après TOMODA, on a pour l'éthanal :

$$\frac{\alpha^2}{1-\alpha} = K + \frac{K_1}{K}[H^+] + \frac{K \times K_2}{[H^+]^2}$$

où α = degré de dissociation de l'éthanolsulfonate.

K = constante de dissociation,

K_1 = 1re constante de dissociation de l'acide H_2SO_3,

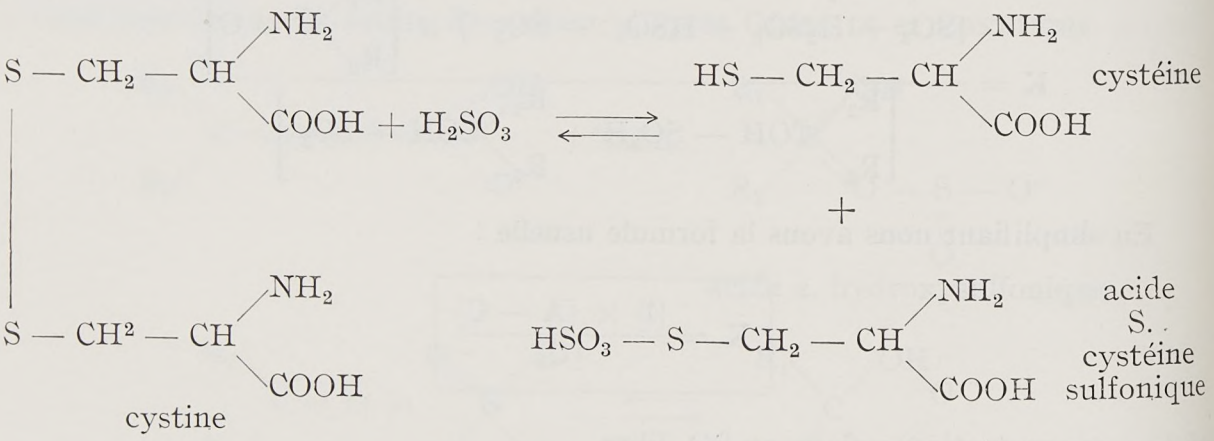
K_2 = 2e constante de dissociation de l'acide H_2SO_3.

Cette formule permet de calculer l'éthanal libre en fonction du pH.

Si malgré quelques incertitudes nous connaissons bien la réaction carbonyle-SO_2, il n'en est pas de même pour les autres réactions d'addition. L'action du SO_2 sur les polyphénols demeure en partie hypothétique, la décoloration souvent constatée des anthocyanes étant attribuée soit à une réduction, soit à une combinaison. Pour les anthocyanes on admet généralement une rupture du cyle oxygéné avec apparition d'une fonction cétone fixant l'anhydride sulfureux. La transformation d'un OH énolique en cétone parfois proposée semble actuellement rejetée (P. RIBÉREAU-GAYON, 1964).

Par contre, il est possible que dans les moûts et les vins jeunes qui contiennent des polyphénols-oxydases il y ait transformation enzymatique de fonctions phénol en fonctions quinone, fixant ensuite l'anhydride sulfureux sans l'oxyder totalement en sulfate. Ce mécanisme serait alors également valable pour les leucoanthocyanes, les catéchines et les acides phénols qui, d'après HENNIG et BURKHARDT (1957) fixent de l'anhydride sulfureux. Ces mécanismes sont mal connus de même que l'action décolorante plus ou moins réversible du SO_2 à l'égard des anthocyanes.

D'un autre côté on connaît le mécanisme de la fixation du SO_2 par la cystéine et par les protéines qui en contiennent, depuis les travaux de CLARKE et ceux, plus récents de DUPUY (1959). La cystine est réduite en cystéine dont la moitié fixe le SO_2 pour donner l'acide S-cystéine sulfonique.



D'après DUPUY (1959) cette réaction expliquerait l'effet antiseptique du SO_2.

Dans tous les cas les combinaisons au SO_2 sont des réactions d'équilibre régies par la loi d'action de masse ; l'équilibre est défini par la constante de dissociation K.

Cette constante a été souvent calculée à des fins analytiques ou technologiques pour un certain nombre de corps carbonylés. Citons à ce sujet, en plus des travaux déjà indiqués, ceux de BURROUGHS et WHITING (1960). Les résultats communiqués sont plus ou moins concordants ; ils sont obtenus dans des conditions variées, parfois inconnues et souvent éloignées de celles de la pratique œnologique.

Étant donné le grand intérêt de ces études, nous avons déterminé les constantes de dissociation K des combinaisons sulfitiques d'un grand nombre de substances se trouvant ou pouvant se trouver dans les moûts et les vins, ou de substances chimiquement voisines.

II — Techniques d'étude de la combinaison de l'anhydride sulfureux

La valeur de K pour une combinaison sulfitique donnée est fonction de la température et du pH. Pour nous placer dans des conditions proches de celles rencontrées dans les vins, nous avons effectué toutes nos déterminations à 20°C, en milieu tamponné et en présence d'alcool. Les substances testées sont dissoutes dans une solution d'acide tartrique N/10 amenée à pH 3,3 par la soude et contenant 10 p. 100 d'éthanol. Il est essentiel d'utiliser des réactifs rigoureusement exempts de fer et surtout de cuivre qui provoquent la formation de composés carbonylés à partir de l'acide tartrique et catalysent l'oxydation des sulfites en sulfates.

Pour chaque substance étudiée, on prépare plusieurs solutions à des concentrations proches de celles rencontrées dans les vins, dans des conditions permettant une détermination correcte de K, c'est-à-dire aboutissant à des teneurs en SO_2 libre et combiné dosables avec le maximum de précision. Ces solutions sont réparties en flacons de 90 ml bouchés et conservés à 20°C, après addition de trois à cinq doses différentes d'anhydride sulfureux sous forme de métabisulfite de potassium. Après réalisation complète de l'équilibre, au bout de quatre ou cinq jours, on dose l'anhydride sulfureux libre et total. Selon les cas (teneur en SO_2, stabilité de la substance testée, pouvoir réducteur propre), on utilise la méthode Ripper simple ou double, la méthode KIELHÖFER-AUMANN ou la méthode ARCHINARD comme il est indiqué par ailleurs. On peut également doser le SO_2 libre et total sur la même prise d'essai acidifiée, puis amenée à pH 9,0.

La présence d'alcool risque de déplacer l'équilibre de la réaction ; d'autre part, le titrage du SO_2 libre à pH inférieur à 1,0 peut ne pas être précis dans certains cas. En fait ces déplacements d'équilibre sont faibles et cette technique correspond aux conditions des dosages œnologiques ; la valeur de K ainsi déterminée est techniquement utilisable, ce qui est le but de ce travail. Les déterminations physiques par polarimétrie ou spectrophotométrie présentent un intérêt théorique mais risquent de conduire à des valeurs de K un peu différentes des valeurs correspondant aux déterminations utilisées en œnologie.

Bien entendu nous avons vérifié le taux de pureté des composés carbonylés impurs ou instables que nous avons utilisés. On peut utiliser pour cette détermination la méthode au bisulfite ou celle à l'hydroxylamine. Dans le premier cas on détermine l'anhydride sulfureux combiné, donc les fonctions carbonylées saturées, en présence d'un fort excès d'anhydride sulfureux libre (MCFADDEN et HOWES, 1938 ; WOLF,

1955), Dans le second cas on dose l'acide chlorhydrique libéré du chlorhydrate d'hydroxylamine réagissant avec les fonctions carbonyle :

$$\rangle C = O + NH_2OH, HCl \rightleftharpoons \rangle C = NOH + H_2O + HCl$$

Ces deux méthodes permettent de déterminer la teneur globale en fonctions carbonyles et donc le taux de pureté maximum du produit considéré. Par contre elles ne précisent pas la pureté réelle s'il y a eu transformation du produit testé en d'autres composés carbonylés. Cette détermination exacte n'est possible que pour les corps dosables de façon spécifique sans substance de référence ; c'est le cas des acides pyruvique et α-cétoglutarique, dosables par voie enzymatique.

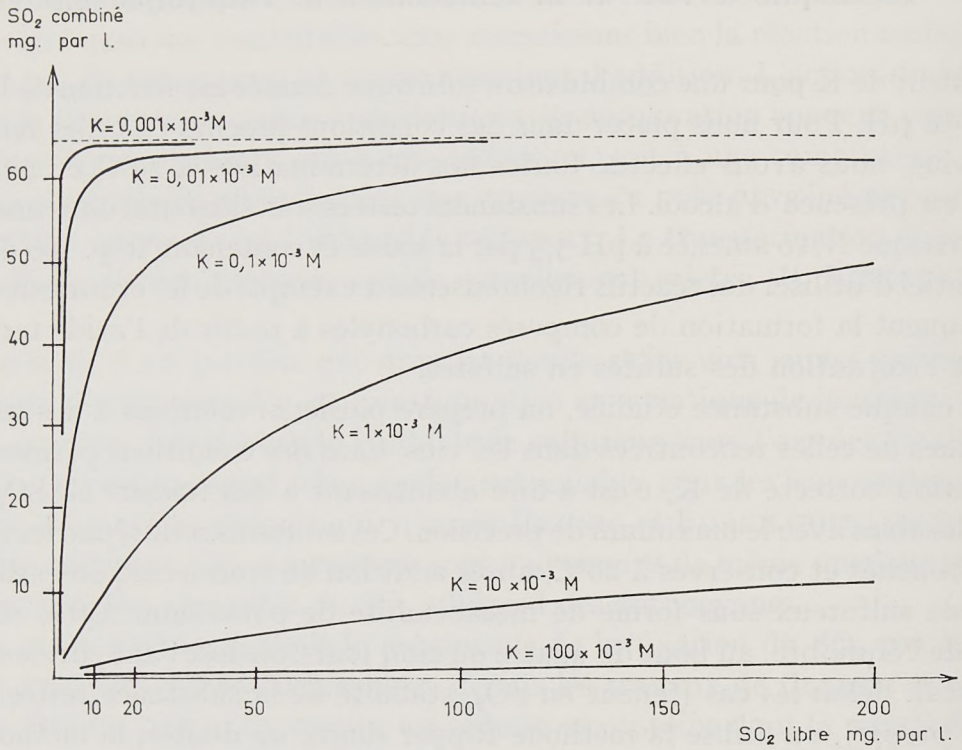


FIG. 10. — *Courbes de combinaison de l'anhydride sulfureux en fonction de la constante de dissociation chimique K*
(concentration de la substance carbonylée A = 10^{-3} M par litre).

Connaissant l'anhydride sulfureux libre (l) et combiné (C) et la concentration exacte en composé à tester (A), on calcule directement K, pour chaque solution, d'après la formule de la page 249. Lorsqu'on dispose de plusieurs déterminations, on calcule la valeur moyenne de K. La moyenne arithmétique ne donne qu'une valeur imprécise car l'erreur relative sur K est égale à l'erreur relative sur l. Ainsi pour les faibles valeurs de l, l'imprécision est grande : pour l = 5 mg ± 1 mg par litre, K n'est connu qu'à 20 p. 100 près. Pour pallier cet inconvénient, nous avons utilisé une méthode graphique, plus sûre, pour déterminer à la fois la valeur de K et son approximation. Le graphique est établi en portant l'anhydride sulfureux libre en abscisses et l'anhydride sulfureux combiné rapporté à une même concentration A en ordonnées. On compare ensuite les points expérimentaux avec un réseau de courbes de référence calculées pour diverses valeurs de K (fig. 10). On détermine ainsi avec facilité la

valeur moyenne de K et l'incertitude de cette valeur (fig. 11). Connaissant K, on calcule diverses autres valeurs caractéristiques du pouvoir de combinaison de l'anhydride sulfureux de la substance considérée, telles que le taux de combinaison de la substance $\frac{[A-C]}{[C]}$ pour 50 mg par l de SO_2 libre et la quantité de SO_2 combiné par millimole et par gramme pour cette même teneur en SO_2 libre (C-L 50). De même on peut calculer l'importance de l'erreur absolue sur ces déterminations.

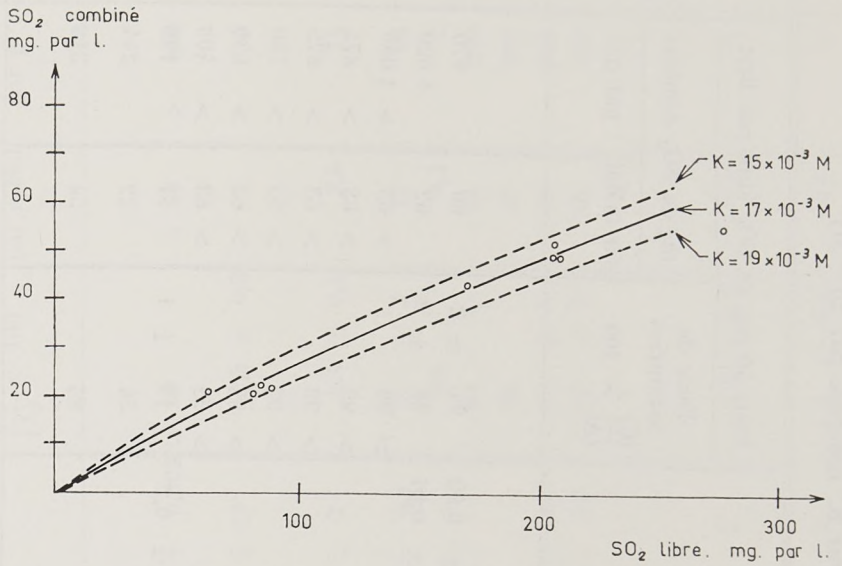


FIG. 11. — *Détermination graphique de la constante de dissociation chimique K d'une combinaison sulfitique. L'exemple concerne l'acide galacturonique.*

$A = 5 \times 10^{-3}$ M ; $K = 17 \pm 2 \times 10^{-3}$ M.

III. Pouvoir de combinaison pour différentes substances

Nous donnons l'ensemble des résultats obtenus en plusieurs tableaux et figures indiquant les caractéristiques de la combinaison de SO_2 calculées en fonction de K, puis ces mêmes caractéristiques mesurées pour une cinquantaine de substances étudiées. Nous comparons ensuite nos résultats personnels avec ceux déjà publiés dont nous avons eu connaissance.

1. *Combinaison du SO_2 en fonction de K*

La figure 12 indique quelques caractéristiques du pouvoir de combinaison de l'anhydride sulfureux en fonction de la constante de dissociation K. On constate ainsi que dans les vins normaux, suivant la valeur K de leur combinaison les substances fixatrices de SO_2 sont ou totalement combinées ou partiellement libres. Par exemple pour 20 mg de SO_2 libre par litre, la combinaison est totale, à 1 p. 100 près, pour des substances pour lesquelles $K \leqslant 0{,}0031 \times 10^{-3}$ M ; elle est de l'ordre de 1 p. 100 ou inférieure lorsque $K \geqslant 31 \times 10^{-3}$ M. Les substances de la première catégorie jouent toujours un rôle important dans les « bilans du SO_2 combiné » et doivent donc être dosées avec une grande précision (éthanal par exemple), alors que les substances de la

TABLEAU 10

Pouvoir de combinaisons de différentes substances vis-à vis de l'anhydride sulfureux

(On obtient K en multipliant la valeur K′ indiquée par 10^{-3} M)

	Formules	PM	K′	Pour 50 mg de SO_2 libre par litre			Teneurs des moûts et des vins par litre	SO_2 fixé (mg par l)
				Taux de saturation $\frac{(C)}{(A)} \times 100$	mg de SO_2 combiné par mMol	mg de SO_2 combiné par g		
Aldéhydes et cétones								
1. Aldéhyde glycérique §.	$CH_2OH—CHOH—CHO$	90	0,05 ± 0,02	94 ± 2	60	670	*	
2. Aldéhyde glycolique §.	$CH_2OH—CHO$	60	0,02 ± 0,01	98 ± 2	62	1 020	*	
3. Propanal	$CH_3—CH_2—CHO$	58	< 0,01	> 99	> 63	> 1 080	*	
4. *n*-Butanal	$CH_3—(CH_2)_2—CHO$	72	< 0,01	> 99	> 63	> 875	?	
5. *i*-Butanal	$(CH_3)_2—CH—CHO$	72	< 0,01	> 99	> 63	> 875	*	
6. *i*-Pentanal	$(CH_3)_2—CH—CH_2—CHO$	86	< 0,01	> 99	> 63	> 730	*	
7. Hexanal	$CH_3—(CH_2)_4—CHO$	100	< 0,01	> 99	> 63	> 630	*	
8. Décanal	$CH_3—(CH_2)_8—CHO$	156	< 0,01	> 99	> 63	> 403	?	
9. Acétone	$CH_3—CO—CH_3$	58	3,8 ± 0,2	17 ± 1	11	190	*	
10. Dihydroxyacétone §.	$CH_2OH—CO—CH_2OH$	90	1,5	34	22	244	0 – 5 mg	< 2
11. Triosephosphates	$CHO—CHOH—CH_2—O—PO_3H_2$ + $CH_2OH—CO—CH_2—O—PO_3H_2$	170 170	0,15	84	54	316		

§ Ces corps sont instables ou impurs ; la valeur K n'est donnée qu'à titre indicatif. §§ K a été établi par un nombre restreint de déterminations.

* Présence en quantité non connue. ? Présence incertaine.

TABLEAU 10 (suite)

	Formules	PM	K′	Pour 50 mg de SO_2 libre par litre			Teneurs des moûts et des vins par litre	SO_2 fixé (mg par litre)
				Taux de saturation $\frac{(C)}{(A)} \times 100$	mg de SO_2 combiné par mMol	mg de SO_2 combiné par g		
Acides carbonyliques								
12. Acide glyoxylique ...	CHO—COOH	74	0,008 ± 0,003	> 99	> 63	> 850	0 – 30 mg	< 30
13. Acide D-glucuronique.	COOH—C(H)—C(H)(OH)—C(H)(OH)—C(H)(OH)—CHO	194	50 ± 10	1,5 ± 0,3	1	5	0 – 1 g	< 5
14. Acide D-galacturonique	COOH—C(H)—C(OH)—C(H)(OH)—C(H)(OH)—CHO, + H_2O	212	17 ± 2	4,4 ± 0,4	2,8	14	0,5 – 1 g	1-15
15. D (+) Glucurone	CHO—$(CHOH)_4$—COOH, — H_2O	176	2,5 ± 0,5	24 ± 3	15	86	?	
16. Acide dioxytartrique §	COOH—CO—CO—COOH	146	200	0,4	0,3	2	?	
17. Acide dioxyfumarique §	COOH—CO—CHOH—COOH	148	0,2	80	51	340	?	
18. Acide oxalacétique §..	COOH—CO—CH_2—COOH	132	0,2	80	59	390	0 – 5 mg	< 2
19. Acide α-cétoglutarique	COOH—CO—CH_2—CH_2—COOH	146	0,5 ± 0,1	61 ± 5	39	267	0 – 200 mg	< 50
20. Acide pyruvique	CH_3—CO—COOH	88	0,3 ± 0,1	72 ± 7	46	520	0 – 500 mg	< 260
21. Acide lévulinique §...	CH_3—CO—CH_2—CH_2—COOH	116	15	5	3	26	?	
Sucres								
22. L (+) Arabinose	CH_2OH—C(H)—C(H)(OH)—C(H)(OH)—CHO	150	40 ± 5	1,8 ± 0,2	1,2	8	< 2 g	< 16
23. D (+) Xylose	CH_2OH—C(H)—C(H)(OH)—C(H)(OH)—CHO	150	80 ± 5	1 ± 0,05	0,6	4	0 – 30 mg	< 2
24. D (—) Ribose§§.....	CH_2OH—C(H)—C(H)(OH)—C(H)(OH)—CHO	150	30	2,5	1,6	11	0 – 100 mg	

§ Ces corps sont instables ou impurs ; la valeur K n'est donnée qu'à titre indicatif. §§ K a été établi par un nombre restreint de déterminations.
* Présence en quantité non connue. ? Présence incertaine.

TABLEAU 10 (suite)

	Formules	PM	K′	Pour 50 mg de SO_2 libre par litre			Teneurs des moûts et des vins par litre	SO_2 fixé (mg par l)
				Taux de saturation $\frac{(C)}{(A)} \times 100$	mg de SO_2 combiné par mMol	mg de SO_2 combiné par g		
Sucres								
25. D (+) Glucose	$CH_2OH—(CHOH)_4—CHO$	180	900 ± 100	0,08 ± 0,01	0,05	0,3	0,5 – 150	50
26. D (+) Mannose	$CH_2OH—(CHOH)_4—CHO$	180	80 ± 5	1 ± 0,05	0,6	3	?	
27. D (+) Galactose	$CH_2OH—(CHOH)_4—CHO$	180	165 ± 10	0,5 ± 0,03	0,3	1,6	< 150 mg	< 2
28. L (+) Rhamnose.....	$CH_3—(CHOH)_4—CHO$	164	165 ± 5	0,5 ± 0,02	0,3	1,6	< 100 mg	2
29. L (—) Fucose §§	$CH_3—(CHOH)_4—CHO$	164	210	0,4	0,3	1,6	?	
30. D (—) Fructose	$CH_2OH—(CHOH)_3—CO—CH_2OH$	180	15 000 ± 5 000	0,005 ± 0,001	0,01	0,01	0,5 – 150 g	< 0,3
31. Fructose 1-6 phosphate	$H_2PO_3—O—CH_2—CO(CHOH)_3—CH_2—O—PO_3H_2$	340	300	0,3	0,2	0,6	?	
32. L (—) Sorbose §§....	$CH_2OH—(CHOH)_2—CO—CH_2OH$	180	110	0,7	0,4	2,4	?	
33. D (+) Maltose	α-D glucose1-4 D glucose, + H_2O	360	800 ± 200	0,08 ± 0,02	0,05	0,15	?	
34. (+) Cellobiose §§ ...	β-D glucose 1-4 D glucose	342	550	0,14	0,1	0,3	?	
35. (+) Lactose	β-D galactose 1-4 D glucose, + H_2O	360	500 ± 100	0,16 ± 0,03	0,1	0,3	?	
36. (+) Saccharose §§ ...	α-D glucose 1-2 D fructose	342	5 400	0,014	0,01	0,03	0 – 16 g	0,5
37. (+) Raffinose.....	D galactose 1-6 D glucose 1-2 D fructose, + $5H_2O$	594	1 800 ± 200	0,04 ± 0,004	0,03	0,06	?	

§ Ces corps sont instables ou impurs ; la valeur K n'est donnée qu'à titre indicatif. §§ K a été établi par un nombre restreint de déterminations.

* Présence en quantité non connue. ? Présence incertaine.

deuxième catégorie n'y interviennent qu'aux fortes concentrations et il suffit parfois de l'estimer approximativement (par exemple le glucose d'un vin peut être estimé au tiers des sucres résiduels).

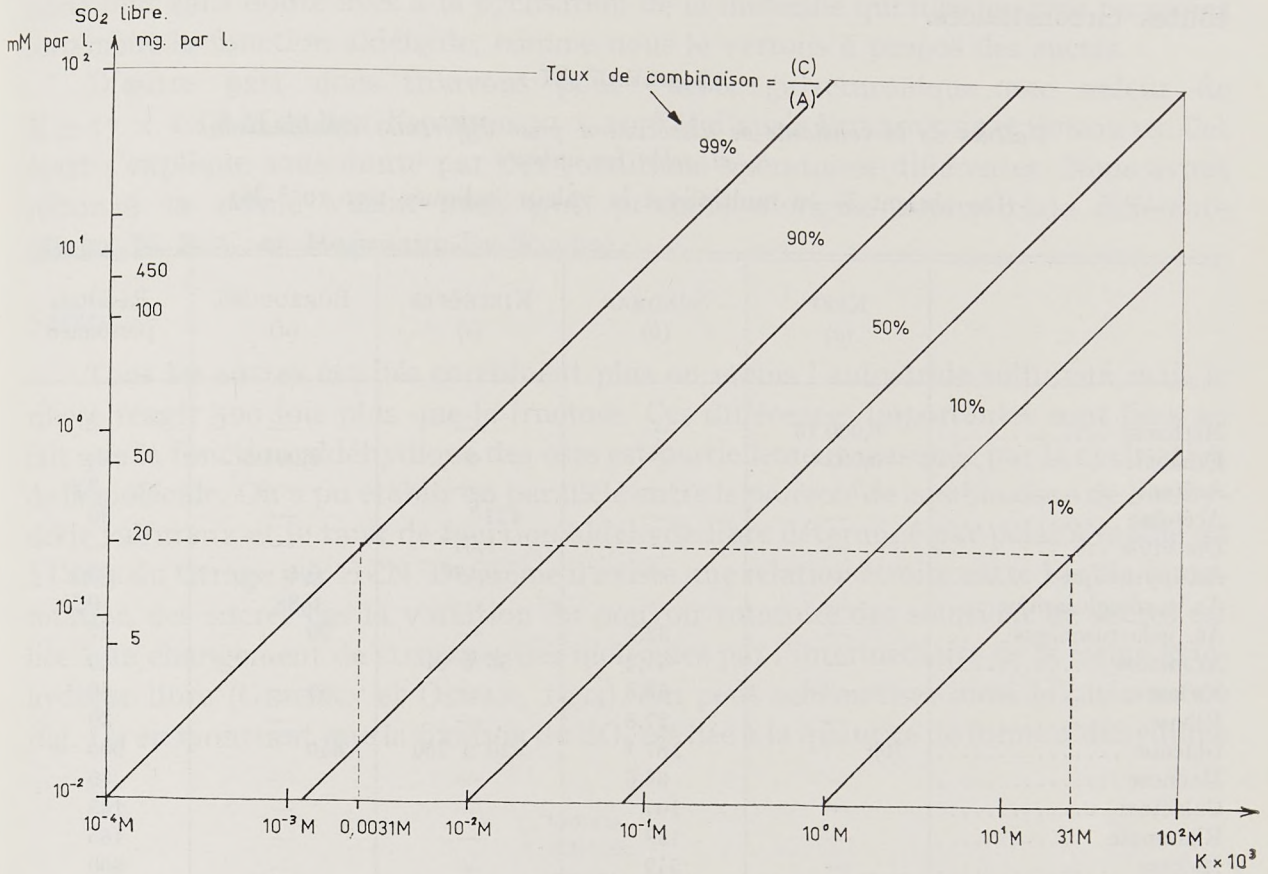


FIG. 12. — *Courbes d'isocombinaison de l'anhydride sulfureux donnant le taux de combinaison d'une substance en fonction de sa constante K et du taux d'anhydride sulfureux libre.*

2. *Pouvoir de combinaison des différentes substances étudiées*

Pour chaque substance étudiée, nous indiquons dans le tableau 10 sa formule, son poids moléculaire, la constante de dissociation K de sa combinaison sulfitique, son taux de saturation et le SO_2 fixé par millimole et par gramme en présence de 50 mg de SO_2 libre par litre, en précisant l'approximation possible. En outre nous indiquons les concentrations approximatives de cette substance dans les moûts et les vins et les quantités de SO_2 qu'elle peut y fixer. Le tableau donne ainsi tous les éléments nécessaires pour connaître le rôle joué par une substance dans la combinaison de l'anhydride sulfureux dans les vins.

Enfin le tableau 11 permet de comparer l'ensemble des résultats publiés sur le sujet.

Aldéhydes.

Les aldéhydes aliphatiques de la série grasse ont tous un pouvoir de combinaison élevé. Cependant le calcul précis en est difficile comme le montre la divergence, par exemple, des résultats donnés par différents auteurs pour l'éthanal.

§ Ces corps sont instables ou impurs ; la valeur K n'est donnée qu'à titre indicatif. §§ K a été établi par un nombre restreint de déterminations.

Il faudrait en effet apprécier de très faibles teneurs en SO_2 libre (< 5 mg par l) avec une grande précision relative. La méthode Ripper ne le permet pas. Le dosage du SO_2 par la fuchsine serait peut-être meilleur mais il suffit pour nous de savoir que dans un vin normal les aldéhydes autres que l'éthanal sont pratiquement saturées en toutes circonstances.

TABLEAU II

Valeurs de la constante de dissociation pour différentes combinaisons et selon les auteurs

(On obtient K en multipliant la valeur indiquée par 10^{-3} M)

	Kerp (*a*)	Sundman (*b*)	Kielhöfer (*c*)	Burroughs (*d*)	Résultats personnels
Méthanal	0,000 13	—	—	—	—
Éthanal	0,002 4	—	—	0,001 5	—
Acétone	3,7	—	—	—	3,8
Acétoïne	—	—	151*	—	80
Diacétyle	—	—	1,84*	—	—
Ac. pyruvique	—	—	0,47*	0,4	0,3
Ac. α-cétoglutarique	—	—	—	0,88	0,5
Ac. galacturonique	—	32,7	—	30	17
Arabinose	—	41,2	53 à 84	—	40
Xylose	—	68,8	—	69	80
Ribose	—	27,8	—	—	30
Glucose	700	587	520 à 750	640	900
Mannose	—	68,8	—	—	80
Galactose	—	104	—	—	165
Rhamnose	—	128	—	—	165
Maltose	—	549	—	—	800
Cellobiose	—	530	—	—	550
Lactose	—	532	—	—	500

(*a*) D'après Paul (1914).
(*b*) D'après Gehman et Osman, (1954) ; t = 19°C ; pH 4,65.
(*c*) (1958) ; t ambiante, pH 3,3.
(*d*) (1960) ; t = 20°C ; pH 3 à 4.
* Valeur calculée d'après une analyse de l'auteur.

Cétones.

L'acétone et le diacétyle combinent l'anhydride sulfureux, alors que la combinaison avec l'acétoïne est quantitativement négligeable dans les vins. La valeur de K donnée pour la dihydroxyacétone est une indication d'ordre de grandeur car il est difficile d'éviter la dégradation de ce corps.

Acides carbonyliques.

Le tableau appelle ici peu de commentaires particuliers, nous y reviendrons en étudiant spécialement chaque acide. On remarque cependant que les deux acides uroniques testés (les acides glucuronique et galacturonique) diffèrent fortement dans leur pouvoir de combinaison malgré la seule intervention d'une fonction alcool secon-

daire en C_4. Cette différence se retrouve de même pour les aldoses correspondants. Par ailleurs la glucurone (γ-lactone de l'acide glucuronique) combine fortement le SO_2 mais il ne semble pas que ce fait soit lié directement à la lactonisation car une autre lactone telle la butyrolactone ne fixe aucunement l'anhydride sulfureux. Ces variations sont sans doute liées à la cyclisation de la molécule qui masque plus ou moins fortement la fonction aldéhyde, comme nous le verrons à propos des sucres.

D'autre part nous trouvons pour l'acide galacturonique une valeur de $K \simeq 17 \times 10^{-3}$ M au lieu d'environ 30×10^{-3} M d'après BURROUGHS et SUNDMAN. Cet écart s'explique sans doute par des conditions opératoires différentes. Nous avons retrouvé la même valeur pour trois produits d'origine commerciale différente (Fluka, N. B. C. et Hoffmann-La Roche).

Sucres.

Tous les sucres étudiés combinent plus ou moins l'anhydride sulfureux mais le ribose réagit 500 fois plus que le fructose. Ces différences importantes sont liées au fait que la fonction aldéhydique des oses est partiellement masquée par la cyclisation de la molécule. On a pu établir un parallèle entre le pouvoir de combinaison de l'anhydride sulfureux et le taux de fonction aldéhyde libre déterminé par polarographie ou à l'aide du titrage par HCN. De même il existe une relation étroite entre K et la mutarotation des sucres car la variation du pouvoir rotatoire des solutions de sucres est liée à un changement de structure des molécules par l'intermédiaire de la forme aldéhydique libre (GEHMAN et OSMAN, 1954). On peut schématiser ainsi le phénomène (fig. 13) en montrant que la fixation du SO_2 est liée à la quantité de forme aldéhydique

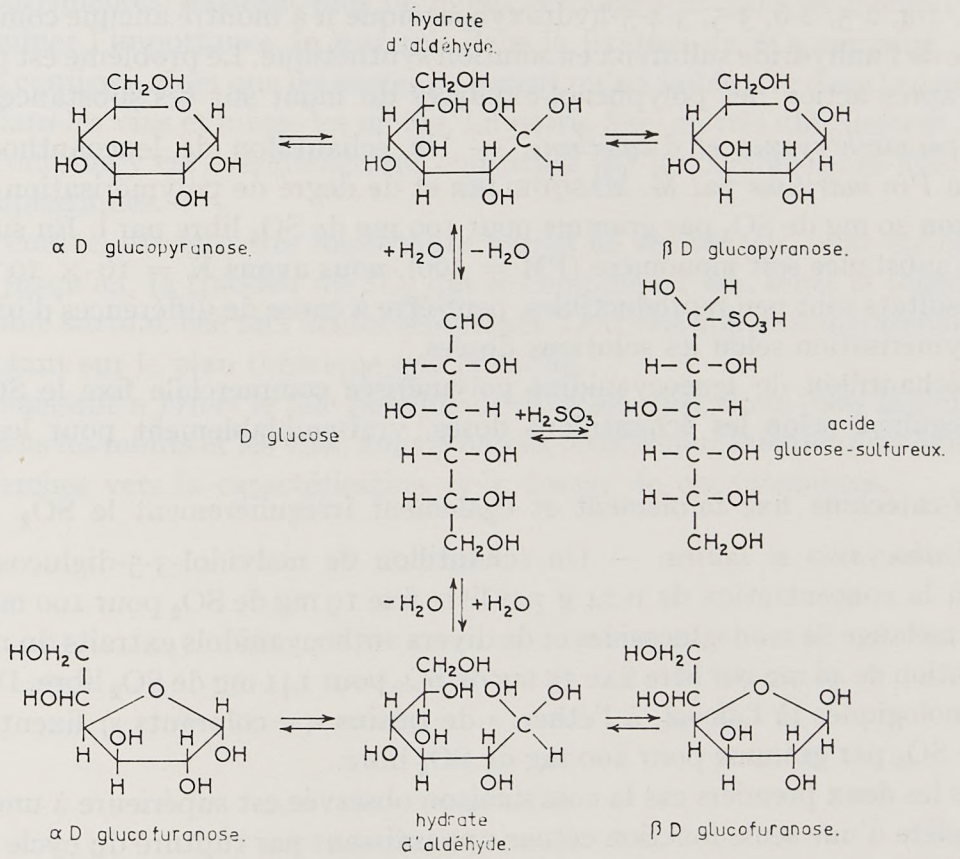


FIG. 13. — *Mécanismes de la fixation de l'anhydride sulfureux par les sucres (cas du glucose).*

libre et à sa réactivité spécifique, plutôt qu'à un arrangement différent des fonctions alcool qui n'ont pas de rôle direct.

Les résultats que nous trouvons concordent bien avec ceux cités dans la littérature, sauf ceux calculés d'après les résultats de FARNSTEINER, donnés par JOSLYN (1952) qui s'écartent considérablement de tous les autres. D'après les résultats détaillés donnés par GEHMAN et OSMAN (1954), on sait en outre que K augmente avec la température, mais ne varie que faiblement avec la concentration en sucre ou le pH, compris entre 2 et 6. Nos observations confirment donc que les sucres n'interviennent que faiblement comme composants fixateurs de l'anhydride sulfureux et soulignent, de ce fait, le rôle essentiel qui doit être accordé à d'autres substances, même si elles sont pondérablement moins importantes. Parmi celles-ci on peut envisager les trioses-phosphates, dont le rôle d'intermédiaire dans la fermentation alcoolique est bien connu, qui combinent assez fortement l'anhydride sulfureux. Nous reverrons plus loin cette éventualité.

Polyphénols.

Nous avons étudié le pouvoir de combinaison des acides cinnamiques, des acides benzoïques substitués, des leucoanthocyanes et de différents tanins. Pour beaucoup de ces substances, nous ignorons leur composition exacte et surtout leurs degrés de polymérisation et d'oxydation qui doivent fortement modifier leurs propriétés (P. RIBÉREAU-GAYON, 1964). Les chiffres indiqués sont simplement indicatifs, à titre d'ordre de grandeur.

1° *Acides phénols.* — Une solution contenant simultanément 100 mg par l de chacun des acides *o.* et *p*-coumarique, férulique, chlorogénique, vanillique, syringique et 4-, 3-4, 2-4, 2-5, 2-6, 3-5, 3-4-5-hydroxybenzoïque n'a montré aucune combinaison mesurable de l'anhydride sulfureux en solution synthétique. Le problème est peut-être différent après action des polyphénol-oxydases du moût sur ces substances.

2° *Leucoanthocyanes et* d-*catéchine.* — Un échantillon de leucoanthocyanidol extrait du *Pin maritime* par M. MASQUELIER et de degré de polymérisation inconnu fixe environ 20 mg de SO_2 par gramme pour 100 mg de SO_2 libre par l. En supposant que cette substance soit monomère (PM = 300), nous avons $K = 16 \times 10^{-3}$ M. En fait les résultats sont peu reproductibles, peut-être à cause de différences d'oxydation et de polymérisation selon les solutions dosées.

Un échantillon de leucocyanidine polymérisée commerciale fixe le SO_2 d'une façon irrégulière selon les échantillons dosés, vraisemblablement pour les mêmes raisons.

La *d*-catéchine fixe faiblement et également irrégulièrement le SO_2.

3° *Anthocyanes et tanins.* — Un échantillon de malvidol-3-5-diglucoside (PM = 642) à la concentration de 0,24 g par litre fixe 19 mg de SO_2 pour 100 mg de SO_2 libre. Un mélange de monoglucosides et de divers anthocyanidols extraits du raisin à la concentration de 48 mg par litre fixe 35 mg de SO_2 pour 141 mg de SO_2 libre. Différents tanins œnologiques (à l'alcool, à l'éther, « de raisins », « colorants ») fixent environ 20 mg de SO_2 par gramme pour 100 mg de SO_2 libre.

Dans les deux premiers cas la combinaison observée est supérieure à une saturation complète d'une seule fonction cétone apparaissant par rupture du cycle oxygéné de la molécule. Il semble donc y avoir d'autres mécanismes mis en jeu pour fixer l'an-

hydride sulfureux ; celui-ci est d'ailleurs partiellement libérable par addition d'un excès d'éthanal ou par acidification. Les phénomènes observés sont donc très complexes et leur étude dépasse le cadre de ce travail : ils doivent être très importants pour les vins rouges et peut-être pour certains vins ayant subi une forte oxydation de leurs polyphénols en polyquinones. En effet nous avons observé que la *p*-quinone combine le SO_2 sans l'oxyder totalement en sulfates.

Acides aminés.

Le mélange des dix acides aminés suivants, à la dose individuelle de 500 mg par litre, ne combine pas l'anhydride sulfureux à pH 3,3 : arginine, acide aspartique, acide glutamique, cystéine, proline, thréonine, valine, leucine, α-alanine et glycine.

La cystine fixe le SO_2 (Dupuy, 1959), mais le dosage iodométrique ne permet pas de déterminer cette combinaison à cause du fort pouvoir réducteur propre de ce corps.

Conclusions

En résumé l'étude systématique des combinaisons de l'anhydride sulfureux en solutions simples s'est avérée très féconde.

En premier lieu, le rappel des notions classiques de la chimie des combinaisons du SO_2 a permis de dégager et de mettre au point une méthode simple de détermination de leur constante de dissociation dans des conditions proches de celles rencontrées en œnologie. Disposant ainsi d'une technique satisfaisante, nous avons pu étudier de façon systématique une cinquantaine de substances (aldéhydes et cétones, acides, sucres, polyphénols) existant plus ou moins certainement dans les moûts et les vins et déterminer l'importance de leur rôle dans la fixation du SO_2 combiné.

Il se confirme alors que les sucres ne jouent qu'un faible rôle dans la combinaison du SO_2 dans les vins et même les moûts. La partie fixe, ou très difficilement libérable, du SO_2 combiné y est essentiellement constituée par les combinaisons avec les aldéhydes aliphatiques.

Par contre, et cette très importante notion ne semble pas avoir été clairement dégagée jusqu'ici, la fraction du SO_2 qui se combine ou non selon la teneur en SO_2 libre semble surtout liée aux acides cétoniques. Leur rôle apparaît maintenant comme essentiel tant sur le plan théorique que pratique.

Connaissant a *priori* le rôle possible de diverses substances dans la combinaison du SO_2 dans les moûts et les vins, nous pouvons maintenant orienter plus efficacement nos recherches vers la caractérisation et le dosage de ces substances.

CHAPITRE III

MÉTHODES ANALYTIQUES

I — Dosage de l'anhydride sulfureux dans les moûts et les vins

Ce dosage ayant une importance particulière pour notre travail, nous avons comparé diverses techniques proposées afin de retenir celle, ou celles, se prêtant le mieux à un travail à la fois rapide et précis, pour la détermination du SO_2 libre et du SO_2 total. Le détail de ces travaux étant publié par ailleurs (BLOUIN et SUDRAUD, 1965), nous n'en rappellerons ici que l'essentiel.

1. *Définitions*

D'après la Sous-Commission d'Analyses de l'Office International du Vin et l'arrêté du 24 juin 1963 fixant les méthodes officielles d'analyses des vins et des moûts en France, on appelle *anhydride sulfureux libre*, l'anhydride sulfureux à l'état de SO_2 et de combinaisons minérales H_2SO_3, $H\,SO_3^-$ et SO_3^{--} ; on appelle *anhydride sulfureux combiné* la différence entre l'anhydride sulfureux total et l'anhydride sulfureux libre.

Ces définitions, universellement admises en œnologie, fixent les objectifs de toute méthode de dosage.

2. *Dosage de l'anhydride sulfureux libre*

Le SO_2 libre est donc constitué par des formes minérales en équilibre d'une part avec l'atmosphère où se trouve le vin, d'autre part avec les formes organiques représentant le SO_2 combiné. Pour un vin donné, la teneur en SO_2 libre trouvée varie ainsi avec la température, les pertes par oxydation ou évaporation et par le déplacement de l'équilibre SO_2 libre — SO_2 combiné. En outre il peut y avoir interférence de certaines substances sur le dosage lui-même. La méthode de dosage idéale doit tenir compte de tous ces facteurs. La température du dosage est fixée à 20°C, après repos du vin pendant quatre jours à cette température d'après les recommandations de l'Office International du Vin.

Parmi les diverses méthodes proposées, iodométriques, colorimétriques, directes ou après distillation, nous avons retenu le titrage direct par l'iode en milieu acide avec une correction due aux substances réductrices naturelles (ou « réductones » selon PAUL) par un deuxième titrage après blocage du SO_2 par l'éthanal (méthode RIPPER modifiée par KIELHÖFER et AUMANN).

3. *Dosage de l'anhydride sulfureux total*

Dans le cas des vins le dosage du SO_2 total suppose une libération du SO_2 combiné qui n'est pas titrable directement. Son oxydation par l'iode en milieu alcalin (méthode JAULMES-ESPEZEL de dosage de l'éthanal par exemple) est en effet inapplicable aux vins toujours riches en substances oxydables par l'iode en milieu alcalin (glucose acides uroniques, polyphénols). Le SO_2 combiné est libérable par hydrolyse alcaline ou par déplacement progressif du SO_2 libre en utilisant la distillation ou l'entraînement gazeux à chaud. Le SO_2 est ensuite dosé par iodométrie ou après transformation en sulfate. Une bonne méthode de dosage doit doser tout le SO_2 présent et rien de plus. Il faut donc une libération complète du SO_2 combiné, une absence de pertes par volatilisation ou oxydation et, en même temps, on ne doit doser aucun autre constituant que le SO_2. On doit éviter les substances réductrices non SO_2 dans l'iodométrie et les substances acides dans l'acidimétrie, que ces substances existent dans le vin à doser ou qu'elles apparaissent en cours de dosage. En outre nous désirons une méthode assez simple, assez rapide, donnant une bonne reproductibilité et une bonne précision.

La comparaison statistique de quelques-unes des nombreuses méthodes proposées nous a permis de choisir et d'adapter plusieurs techniques ayant des utilisations différentes.

La méthode Ripper simple convient bien aux dosages en série destinés à fournir des renseignements technologiques.

La méthode complexométrique modifiée donne des résultats très précis même pour les faibles teneurs en SO_2 total où elle est particulièrement indiquée (pas d'interférences des substances iodophiles).

La méthode Archinard modifiée a été retenue comme méthode rapide, la méthode de référence, très précise, étant réservée, à cause de sa complexité aux déterminations très importantes ou litigieuses.

4. *Techniques opératoires*

Nous ne décrivons ici que les détails essentiels des modes opératoires, renvoyant aux traités de chimie habituels pour la préparation des solutions ou les calculs ordinaires de titre de solutions et de volume de prise d'essai.

Dosage de l'anhydride sulfureux libre.

Verser dans un becher 10 ou 25 ml de vin et ajouter dans l'ordre, quelques gouttes d'empois d'amidon à 1 p. 100 fraîchement préparé et un ou deux ml d'acide sulfurique au tiers, le milieu est sensiblement N en H_2SO_4.

Titrer aussitôt par l'iode (N/32 ou N/100 par exemple) jusqu'à coloration bleue persistant quelques secondes.

Opérer de même sur 25 ou 50 ml de vin mis préalablement 10 à 15 mn en contact avec 10 ml d'éthanal à 5 p. 1 000 (environ M) fraîchement distillé et quelques mg de complexon III. Pour préparer la solution d'éthanal, on distille 5 ml de paraldéhyde dans 100 ml d'eau acidifiée par 5 ml d'acide sulfurique au tiers ; on recueille 50 ml d'une solution environ 10 p. 100.

La différence entre le premier et le deuxième titrage, compte tenu des éventuelles différences des volumes des prises d'essai et des titres des solutions d'iode, correspond

au « SO_2 libre réel », le deuxième dosage correspondant aux « réductones ». c'est-à-dire aux substances réductrices en milieu n'ayant pas réagi avec l'éthanal au pH du vin.

Remarques. — Il est très important d'effectuer ce dosage dès l'ouverture de l'échantillon à analyser, afin d'éviter toute perte par oxydation ou évaporation.

Il est essentiel de n'acidifier un échantillon qu'au moment de son dosage qui doit être effectué aussi rapidement que possible.

Pour les vins rouges l'obtention de résultats précis nécessite l'emploi de la méthode ampérométrique ; le titrage est alors rapidement effectué dans un poudrier étroit et fermé, avec une vive agitation magnétique.

La stricte observance de ces trois règles simples est indispensable pour obtenir des résultats corrects.

Dosage de l'anhydride sulfureux total.

a) *Méthode Ripper simple.* — Verser 25 ml de vin dans un poudrier, puis ajouter 10 ml de soude N et quelques mg de complexon III. Attendre 15 mn, ajouter quelques gouttes d'empois d'amidon fraîchement préparé et acidifier par cinq à six ml d'acide sulfurique au tiers. Titrer rapidement par l'iode N/32 ou N/50 par exemple. Il est possible de doser de six à dix échantillons dans une même série en n'acidifiant qu'au moment du titrage.

b) *Méthode complexométrique modifiée.* — On peut utiliser l'appareil décrit pour la méthode usuelle officielle ou plus simplement un appareil à distiller constitué d'un ballon à fond rond de 250 ml, dans lequel arrive l'extrémité d'une ampoule à brome de 50 à 100 ml, et qui est relié à un réfrigérant en bas duquel on place un erlenmeyer de 300 ml pour recueillir le distillat. Plus simplement encore on peut utiliser les ballons à oxydation décrits par RIBÉREAU-GAYON et PEYNAUD, (1958).

Verser dans le ballon de 250 ml, 10 à 20 ml d'acide chlorhydrique à 5 p. 100 et quelques mg de complexon III. Porter à l'ébullition pour chasser tout l'air contenu dans l'appareil. Adapter ensuite à la sortie du réfrigérant un erlenmeyer contenant 2 ml d'eau oxygénée à 100-110 volumes exempte de sulfates (neutraliser par la baryte en présence de bleu de bromophénol et filtrer), 15 ml de chlorure de baryum M/50 et 2 ml d'acide chlorhydrique 2N. Ces modifications de la méthode originale assurent l'oxydation du SO_2 et la précipitation des sulfates au fur et à mesure de leurs apparitions : la manipulation est plus simple et la réaction plus complète. Introduire alors lentement dans le ballon 25 ml de vin par l'ampoule extérieure sans arrêter l'ébullition, ni faire entrer d'air, rincer deux fois et distiller pendant 3 à 5 mn (10 à 20 ml).

Rincer l'extrémité du réfrigérant qui plongeait dans le liquide de réception. Il est alors possible de titrer aussitôt l'excès de chlorure de baryum, ou mieux après avoir porté le distillat à l'ébullition et l'avoir laissé refroidir.

Ajouter 5 ml de tampon ammoniacal (5 g de complexon magnésien EDTA-K_2 Mg, 35 g de chlorure d'ammonium, 100 ml d'eau et ammoniaque pour analyses q. s. p. 1 l), 4 ou 5 gouttes d'indicateur coloré préparé depuis moins de trois semaines (0,5 g de noir d'ériochrome T, 4,5 g de chlorhydrate d'hydroxylamine et éthanol 96° q. s. p. 100 ml). Titrer par l'EDTA-Na_2H_2 M/100 exact (titré par $CaCO_3$ par exemple) avec une vive agitation magnétique jusqu'au virage au bleu pâle sans trace de rouge. On effectue un dosage à blanc dans les mêmes conditions pour apprécier la faible

consommation de chlorure de baryum dans les réactifs. On peut ainsi utiliser du chlorure de baryum de titre approximatif.

La différence entre les deux dosages donne la quantité de chlorure de baryum précipité et donc la teneur en SO_2 dans la prise d'essai.

Remarques. — Pour un travail moins précis on peut supprimer la purge de l'air dans l'appareil. L'expérience montre une perte en SO_2 par oxydation de 2 à 5 mg par litre seulement.

c) *Méthode Archinard modifiée.* — On conduit la distillation comme ci-dessus, avec ou sans désaération de l'appareil, en recueillant le distillat dans 25 ml de tampon phosphate pH 7,0 (15 g de phosphate disodique et 3,35 g de phosphate monopotassique par litre) et 10 ml d'éthanal à 1 p. 100 fraîchement distillé.

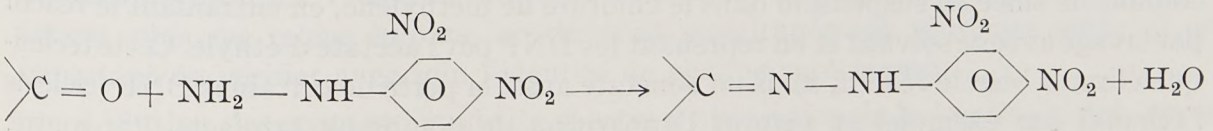
Après distillation, on rince l'extrémité du réfrigérant et on neutralise le distillat par une solution alcaline (30 g d'acide borique et 40 g de soude par litre) en présence de phénolphtaléine. On titre par l'iode en présence d'empois d'amidon.

Cette technique simple, comportant un minimum de risques d'erreurs, permet l'obtention rapide de résultats précis.

d) *Méthode de référence.* — Nous avons utilisé le mode opératoire décrit dans le *Journal Officiel* du 20 septembre 1963.

II — Caractérisation chromatographique des composés carbonylés

L'identification directe des composés carbonylés n'est pas possible en milieu complexe. Habituellement on les sépare et on les caractérise par chromatographie. On a pu ainsi séparer diverses aldéhydes et cétones libres sur papier, sur couche mince, sur colonne adsorbante ou d'échangeurs d'ions et par chromatographie en phase gazeuse, ainsi que divers acides carbonyliques sur papier ou sur colonnes. Le plus souvent, cependant, les composés carbonylés sont séparés sous forme des composés d'addition avec des réactifs spécifiques de la fonction carbonyle. En général les composés ainsi obtenus ne sont pas volatils et sont plus stables quant à leurs propriétés physiques (forme cristalline, température de fusion, spectre d'absorption de la lumière) et quant à leurs caractéristiques chromatographiques. On utilise les produits de condensation avec la carbazide et ses dérivés, l'aldéhyde salicylique, le sulfite de sodium, la phénylène-diamine et ses dérivés et surtout l'hydrazine et ses nombreux dérivés, particulièrement la 2-4 dinitrophénylhydrazine dont les possibilités dans l'étude des boissons ont été récemment soulignées (Genevois, 1964) : simplicité de préparation, facilité de révélation, stabilité des dérivés obtenus. Nous avons effectué nous-mêmes toutes les séparations sous forme 2-4 dinitrophénylhydrazones se formant selon la réaction ci-dessous :



dinitrophénylhydrazine (DNPH)

dinitrophénylhydrazone (DNP)

Du fait de la liaison C=N on constate souvent l'existence d'une isomérie *cis-trans* aboutissant à deux DNP de propriétés différentes (exemple : acide pyruvique).

1. *Principes de la séparation chromatographique des dinitrophénylhydrazones*

Formation des dinitrophénylhydrazones.

La réaction est particulièrement facile en milieu acide, avec une vitesse variable selon le composé carbonylé considéré et l'excès de réactif mis en jeu. On a ainsi préconisé des solutions de 5 p. 100 à 1 p. 1 000 dans HCl, H_3PO_4, H_2SO_4, $HClO_4$, réagissant de 5 mn à plusieurs jours. En outre nous avons remarqué personnellement que les aldéhydes aliphatiques combinés à l'anhydride sulfureux, comme c'est le cas habituel dans les vins, ne réagissent pas directement avec le DNPH, contrairement aux acides carbonyliques qui sont moins énergiquement combinés et réagissent facilement. Ainsi faut-il hydrolyser les combinaisons aldéhydes—SO_2 en milieu alcalin avant l'addition de DNPH, mais, l'expérience le montre, il est inutile de détruire le SO_2 par oxydation par l'iode. Cette oxydation complique la manipulation et risque de faire apparaître de nouvelles substances, formées par exemple à partir des sucres.

Après divers essais préalables, nous avons généralement adopté une solution à 5 p. 1 000 ou 5 p. 100 (M/40 ou M/4) dans l'acide phosphorique ou dans l'acide sulfurique, en remplacement de la solution à 1 p. 1 000 dans l'acide chlorhydrique précédemment utilisée pour l'obtention de chromatogrammes simplifiés (Blouin et Peynaud, 1963). On laisse réagir de 5 à 15 mn, un temps plus long ne modifiant pas l'aspect quantitatif des chromatogrammes obtenus mais augmentant les risques de création d'artefacts et de réactions secondaires avec les sucres.

Extraction des dinitrophénylhydrazones.

Les DNP sont peu solubles en milieu aqueux et précipitent lorsqu'elles sont à une concentration suffisante. Dans le cas des vins, nous avons préféré utiliser leur grande solubilité dans divers solvants organiques pour les extraire avant précipitation. Parmi une longue liste de solvants possibles, nous avons adopté l'acétate d'éthyle comme solvant non sélectif, le benzène pour les cétoacides monocarboxyliques, le *n*—butanol pour les cétoacides dicarboxyliques (Friedemann et Haugen, 1943) et l'heptane pour les composés carbonylés non acides. L'agitation manuelle suivie d'une décantation suffit habituellement à une étude qualitative.

Purification et fractionnement des dinitrophénylhydrazones.

L'acétate d'éthyle, le butanol et le benzène entrainent les DNP et le réactif en excès. En lavant par une solution alcaline, on entraîne spécifiquement les DNP des acides carbonyliques. La phase organique restante contient les DNP des substances neutres et l'excès de réactif. Celui-ci peut être éliminé en fixant les DNP sur une colonne de silice en suspension dans le chlorure de méthylène, en entraînant le réactif par lavage avec ce solvant et en reprenant les DNP par l'acétate d'éthyle. Cette technique élimine bien le réactif, mais on constate aussi la perte de certaines DNP (celle de l'éthanal par exemple) et surtout l'apparition de nombreux artefacts. Par contre, l'heptane entraîne toutes les DNP des substances neutres que nous avons examinées et n'entraîne aucune trace de réactif, d'où son grand intérêt.

Chromatographie.

Après avoir utilisé en premier lieu la séparation des DNP sur colonnes, on a employé la séparation sur papier et plus récemment sur couche mince. On peut également isoler les carbonyles comme DNP, puis les régénérer par le méthanal, l'acide α-cétoglutarique ou l'acide lévulinique avant de les séparer par chromatographie en phase gazeuse. Parfois on réduit les DNP des cétoacides en l'acide aminé correspondant qui est ensuite identifié par les méthodes habituelles.

Personnellement nous nous sommes limité à la séparation des DNP sur papier et sur couche mince. Dans un cas comme dans l'autre, il a été préconisé des dizaines de combinaisons solvant-support plus ou moins adaptées à tel ou tel travail. Habituellement la chromatographie sur papier fait appel à des solvants neutres ou alcalins pour l'étude des DNP d'acides carbonylés. On sépare les DNP de carbonyles neutres par des solvants acides ou on utilise la technique des phases inversées sur papiers imprégnés de substances hydrophobes. La chromatographie en couche mince sur silice, alumine, poudre de cellulose ou poudre de polyamide utilise des solvants neutres ou acides. Sa grande rapidité et sa souplesse d'emploi lui offrent des possibilités non encore pleinement exploitées.

Révélation des chromatogrammes.

Les DNP sont naturellement colorées en jaune plus ou moins orangé selon leur nature et leur concentration. On améliore légèrement le seuil de détection en observant les chromatogrammes sous lumière ultraviolette : les différents spots se détachent alors en brun et on peut noter certaines fluorescences. Certaines sont des artefacts qui doivent être interprétés avec prudence.

Après examen direct, on obtient d'importants renseignements supplémentaires en pulvérisant sur les chromatogrammes une solution alcaline (NaOH, Na_2CO_3, KOH dans l'alcool). Il apparaît diverses colorations jaune, brune, rouge, mauve, caractéristiques de certains corps et facilitant les identifications. La pulvérisation d'oxydants (I_2, MnO_4K, ferricyanure de potassium) ou de réducteurs (SO_2) fait parfois apparaître de nouvelles couleurs, mais les résultats sont peu reproductibles et donc difficiles à exploiter. Remarquons que les artefacts ont souvent des colorations particulières (jaune vif, bleue et mauve) dont il faut tenir compte.

Identification.

Comme il est d'usage en chromatographie, les DNP sont identifiées en comparant leurs Rf et leurs colorations avant et après révélation à des DNP-témoins obtenues et observées dans les mêmes conditions. Éventuellement on a recours à la technique des témoins internes. Plusieurs composés carbonylés étant peu stables, et commercialement plus ou moins impurs, ou donnant simultanément plusieurs spots, il est important de vérifier avec soin l'identité de chaque spot témoin.

L'élution des spots et l'étude du spectre d'absorption de la lumière (infra rouge, visible, ultra-violet) de l'éluat peut permettre des identifications plus précises, ou au moins donner des indications sur la nature de la substance considérée.

2. *Techniques de séparation chromatographique des dinitrophénylhydrazones*

Parmi les nombreuses variantes que nous avons essayées nous avons choisi un mode opératoire satisfaisant pour notre travail, à la fois suffisamment simple pour se prêter au travail en série et suffisamment sûr (El Hawary et Thompson, 1953 ; Virtanen et coll. 1953 ; Mac Ardle, 1957).

Préparation des dinitrophénylhydrazones des acides carbonyliques.

On mélange dans un tube à essai 5 ml de vin ou de moût et 1 ml de réactif (solution filtrée sur verre frité de DNPH à 5 p. 100 dans l'acide phosphorique à 60 p. 100 dans l'alcool à 96° ou à 1 p. 100 dans l'acide sulfurique au quart). Après 4 à 15 minutes de réaction, on extrait par 8 à 10 ml d'acétate d'éthyle (ou éventuellement de benzène ou de *n*—butanol) en agitant à deux ou trois reprises.

Après décantation, on élimine par pipetage la phase aqueuse devenue incolore (s'il n'en est pas ainsi reprendre par 5 ml de solvant). On entraine ensuite les DNP des acides par agitation de la phase organique avec 5 ml de carbonate de sodium à 10 p. 100. Après une nouvelle décantation, on élimine la phase organique. La phase aqueuse est acidifiée par la quantité nécessaire d'acide chlorhydrique au quart pour libérer les DNP de leurs sels avant de les reprendre par 5 à 10 ml d'acétate d'éthyle.

On évapore à sec à l'air libre et le résidu est chromatographié ou conservé en tubes bouchés. On peut reprendre par l'acétate d'éthyle ou par un solvant moins volatil (éthanol, méthanol à 3 p. 100 d'ammoniaque, tampon phosphaté) pour une chromatographie semi-quantitative.

Préparation des dinitrophénylhydrazones des carbonyles neutres.

On opère comme il a été indiqué ci-dessus mais en ajoutant le réactif seulement 15 mn après avoir alcalinisé 5 ml de vin par 2 ml de soude normale et en faisant une seule extraction par 8 à 10 ml d'heptane ; la phase organique ne renferme alors que les DNP des substances neutres.

Chromatographie des dinitrophénylhydrazones des acides carbonyliques.

Chromatographie sur papier. Parmi une vingtaine de solvants essayés, nous avons retenu quatre solvants alcalins, donnant des résultats assez voisins, et deux solvants acides pour la séparation particulière de l'acide mésoxalique (Lederer, 1959; Whiting et Goggins, 1960).

1. *n*—Butanol,	éthanol 96°,	ammoniaque 0,5N,	7-1- 2*v*/*v*
2. *n*—Pentanol,	*n*—propanol,	ammoniaque,	65-5-30*v*/*v*
3. *n*—Pentanol,	éthanol 96°,	eau,	9-1- 3,2*v*/*v*

Avec ce solvant la chromatographie s'effectue en présence de vapeurs d'ammoniaque. Ce mélange est monophasique contrairement au mélange 9-1-4 habituellement préconisé.

4. *n*—Butanol saturé par l'ammoniaque 3 p. 100 dans l'eau.
5. *n*—Butanol-acide formique-eau, 10-3-10.
6. *n*—Pentanol-acide formique 5 N, 1-1.

On effectue une chromatographie ascendante sur papier Whatman n° 4 (rapide) ou Arches 302 (lent).

A l'aide des quatre premiers solvants, nous avons essayé systématiquement la chromatographie des DNP des acides carbonyliques dont nous disposions, à savoir : acides pyruvique (CH_3—CO—COOH), hydroxypyruvique (CH_2OH—CO—COOH) phénylpyruvique (C_6H_5—CH_2—CO—COOH), diméthylpyruvique ou α-cétoisovalérique, $\begin{pmatrix} CH_3 \\ CH_3 \end{pmatrix}$>CH—CO—COOH) lévulinique ou γ-cétovalérique CH_3—CO—CH_2—CH_2—COOH, α-cétobutyrique (CH_3—CH_2—CO—COOH), oxalacétique (COOH—CH_2—CO—COOH), α-cétoglutarique (COOH—CH_2CH_2—CO—COOH), oxalosuccinique

$$\begin{array}{l} \text{COOH} \\ | \\ \text{(COOH—CH}_2\text{—CH—CO—COOH)} \end{array}$$

mésoxalique (COOH—CO—COOH), dioxytartrique (COOH—CO—CO—COOH), dioxyfumarique ou dihydroxymaléique (COOH—CHOH—CO—COOH). et glyoxylique (CHO—COOH), soit douze acides cétoniques et un acide aldéhydique.

Après examen sous lumière ultra violette, chaque chromatogramme est révélé par pulvérisation du mélange extemporané 1-4 : soude 10 N, éthanol 96°, qui fait apparaître les différentes couleurs sans trop détériorer le papier, puis est immédiatement photographié en couleurs. On établit un chromatogramme de référence réunissant les différents spots de substances connues, ce qui facilite les identifications des chromatogrammes obtenus avec chaque échantillon de moût ou de vin.

Chromatographie en couche mince. Nous avons utilisé comme support la silice G (Merck) en couche de 0,25 mm d'épaisseur avec comme solvant le mélange : Éther éthylique — hexane — acide acétique — acide propionique, 75-65-5-5 (Hebré, 1964, communication personnelle).

On procède ensuite comme dans le cas de la chromatographie sur papier, en effectuant rapidement révélation et photographie. Les colorations observées ici sont particulièrement fugaces.

Chromatographie des dinitrophénylhydrazones de carbonyles neutres.

L'emploi de la chromatographie sur papier étant dans ce cas très délicate, nous avons, après essais préablables, utilisé uniquement la chromatographie sur couche mince de silice avec le mode opératoire précédent.

A la suite d'études systématiques de plusieurs solvants, dont nous faisions varier le rapport des constituants, nous avons adopté les mélanges suivants :

1. Benzène-éther de pétrole (45°-70°), acétate d'éthyle, 170-25-5, (Suomalainen et Ronkainen, 1963).
2. Benzène-éther de pétrole (45°-70°), acétate d'éthyle, 40-60-1.
3. Hexane-acétate d'isoamyle-éther, 150-30-5 (Hebré, 1964).
4. Hexane-acétate d'isoamyle-éther, 150-20-10.

Ces mélanges ont des pouvoirs éluants variés et permettent ainsi des séparations différentes, particulièrement en utilisant la chromatographie multiple. On notera que ces solvants volatils sont sensibles à de légères variations de composition et qu'il importe de n'effectuer les identifications qu'avec un témoin migrant sur la même plaque que les échantillons étudiés.

La mise au point de ces différentes techniques a permis l'étude des composés carbonylés de nombreux moûts et vins. Ces substances étaient jusqu'à présent mal connues, faute de méthodes analytiques appropriées. Depuis nos premiers travaux sur ce sujet leur étude a largement progressé, comme en témoigne une publication récente (GENEVOIS, 1964).

III — Dosages des composés carbonylés des moûts et des vins

Comme nous le verrons plus loin, les acides pyruvique, α-cétoglutarique et oxalacétique existent dans les vins, ainsi que vraisemblablement la dihydroxyacétone et la dihydroxyacétone-phosphate. Nous avons entrepris de fixer une méthode de dosage de ces corps.

On connaît de nombreuses réactions colorées de l'acide pyruvique, en particulier avec le nitroprussiate de sodium et l'aldéhyde salicylique, ainsi qu'avec la dinitrophénylhydrazine. Il est également possible de le décarboxyler par le sulfate cérique ou enzymatiquement par la carboxylase. Il peut en être de même pour l'acide oxalacétique après sa décarboxylation en acide pyruvique, éventuellement avec mesure du gaz carbonique dégagé. L'acide α-cétoglutarique est oxydable en acide succinique que l'on dose ensuite. Il peut aussi donner lieu à une réaction enzymatique de transamination avec l'acide aspartique, accompagnée d'un dégagement mesurable de gaz carbonique. Enfin la dihydroxyacétone donne une réaction peu spécifique avec le résorcinol. On peut également utiliser une séparation chromatographique des dinitrophénylhydrazones suivie d'une élution puis d'une colorimétrie ou d'une réduction en acides aminés.

Malgré l'intérêt de certaines de ces méthodes, récemment encore les seules possibles, nous les avons abandonnées au profit des méthodes enzymatiques optiques, ou tests optiques de Warburg, dont ce fut alors une des premières utilisations en œnologie analytique. Sans revenir sur les détails de ces dosages exposés ailleurs (BLOUIN, 1964), nous en rappelerons brièvement les caractéristiques essentielles avant d'indiquer les modes opératoires utilisés.

1. *Principes généraux des dosages enzymatiques optiques*

En présence d'un enzyme spécifique (comme les récents traités de biochimie, nous adoptons le masculin pour enzyme et coenzyme), un coenzyme non spécifique transforme le substrat à doser, la transformation étant stœchiométrique par un choix convenable du mode opératoire.

$$\text{A} + \text{coenzyme–1} \underset{1}{\overset{\text{enzyme}\ 2}{\rightleftharpoons}} \text{B} + \text{coenzyme–2}$$

La détermination du produit de transformation ou d'une des formes du coenzyme permet d'obtenir le taux du substrat à doser.

Pour les dosages envisagés ici, nous avons en général une réduction de la fonction cétone en fonction alcool secondaire par la nicotinamide adénine dinucléotide réduite

ou NAD-H (anciennement appelée DPN-H) en présence d'une déshydrogénase avec formation de nicotinamide adénine dinucléotide oxydée ou NAD (anciennement appelée DPN).

$$= CO + NAD\text{–}H + H^+ \underset{1}{\overset{\text{déshydrogénase}\ 2}{\rightleftharpoons}} -CHOH- + NAD^+$$

Dans la cas de l'acide α-cétoglutarique, il y a en plus fixation d'ammoniaque.

Sachant que seule la forme réduite NAD-H absorbe la lumière à 340 mμ, la mesure optique du NAD-H disparu permet de calculer simplement la quantité de composé carbonylé mis en jeu.

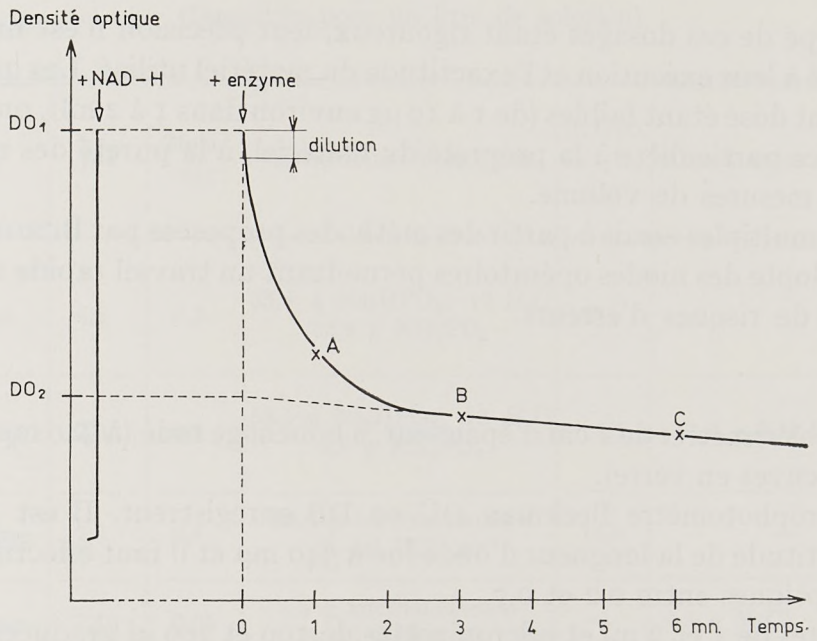


FIG. 14. — *Évolution de la densité optique du milieu au cours d'un dosage enzymatique optique (cas d'une réduction).*

La réaction est ainsi conduite. A une prise d'essai convenablement diluée et tamponnée, on ajoute du NAD-H et on mesure la densité optique du milieu soit DO_1. On ajoute alors la déshydrogénase spécifique. La densité optique du milieu décroît rapidement, puis lentement (fig. 14). Par extrapolation de la droite BC, on détermine DO_2 correspondant à une réaction instantanée. La différence $DO_1 - DO_2 = \Delta$ DO permet de calculer simplement la quantité de substrat se trouvant dans la prise d'essai. DO_1 est corrigé de la dilution effectuée par l'apport de l'enzyme et Δ DO de la valeur δ DO d'un essai à blanc effectué dans les mêmes conditions.

Connaissant le coefficient d'extinction moléculaire ε du NAD-H, on a :

$$q = \frac{\Delta\ DO \times V \times PM}{\varepsilon \times d} \times \text{dilution}$$

q = quantité de substrat dans l'échantillon analysé.
V = volume final colorimétré.
PM = poids moléculaire du substrat dosé.
d = épaisseur de la cuve à colorimétrer.

Avec des conditions opératoires constantes, on a plus simplement :

$$q = \Delta \text{ DO} \times k$$

k étant une constante

Cette technique de dosage est particulièrement intéressante en raison de sa haute spécificité, caractéristique essentielle des enzymes, de sa grande sensibilité (on dose généralement moins de 0,2 µM par prise d'essai), de sa simplicité (les purifications ou séparations préalables étant généralement inutiles), de son vaste champ d'application et de sa rapidité (plusieurs dizaines de dosages par jour). Un mode opératoire correct donne en outre une excellente précision.

2. *Techniques des dosages*

Le principe de ces dosages étant rigoureux, leur précision n'est limitée que par le soin apporté à leur exécution et l'exactitude du matériel utilisé. Les quantités absolues de substrat dosé étant faibles (de 1 à 10 µg environ dans 1 à 2 ml), on doit attacher une importance particulière à la propreté du matériel, à la pureté des réactifs et à la précision des mesures de volume.

Après de multiples essais à partir des méthodes proposées par BERGMEYER (1963), nous avons adopté des modes opératoires permettant un travail rapide et comportant un minimum de risques d'erreurs.

Matériel.

Cuves à colorimétrer de 1 cm d'épaisseur, à bouchage rodé (à 340 mµ il est possible d'utiliser des cuves en verre).

— Spectrophotomètre Beckman DU ou DB enregistreur. Il est important de vérifier l'exactitude de la longueur d'onde lue à 340 mµ et il faut effectuer les lectures de densités optiques entre 0,2 et 0,7.

— Pipettes de 1 et 2 ml et micropipettes de 100 et 200 µl graduées. On évite la contamination des réactifs en affectant toujours la même pipette au même réactif.

Solutions enzymatiques.

Nous avons utilisé les enzymes et coenzymes Boehringer (Mannheim) dans les solutions suivantes :

NAD-H : 2 à 4 mg de produit sec par ml de solution de bicarbonate de sodium à 1 p. 100. La concentration est choisie de telle façon que 50 µl, par exemple, de solution donnent une densité optique de 0,5 à 0,7 à la prise d'essai.

ATP (adénosine triphosphate) : 60,5 mg dans 1 ml d'eau ; neutraliser par la soude décinormale et ajuster à 2 ml.

LDH (lacticodéshydrogénase) : solution à 0,75 mg de protéines par ml dans le sulfate d'ammonium 2M préparée à partir de la solution commerciale à 5 mg par ml.

GLDH (glutamatedéshydrogénase) : solution à 2 mg de protéines par ml dans le sulfate d'ammonium 2M préparée à partir de la solution commerciale à 20 mg par ml.

MDH (malicodéshydrogénase) : solution à 0,5 mg de protéines par ml dans le sulfate d'ammonium 2M préparée à partir de la solution commerciale à 10 mg par ml.

GK (glycérokinase) : solution à 0,3 mg de protéines par ml dans le sulfate d'ammonium 2M préparée à partir de la solution commerciale à 1 mg par ml.

GDH (glycérophosphate déshydrogénase) : solution à 3 mg de protéines par ml dans le sulfate d'ammonium 2M préparée à partir de la solution commerciale à 10 mg par ml.

Ces réactifs sont conservés à + 4°C, sauf la solution de NAD-H maintenue à — 15°C. Il est évidemment possible d'augmenter les concentrations indiquées pour obtenir des réactions plus rapides ou utiliser des volumes plus faibles.

Solutions tampons.

Nous utilisons les solutions ci-après fraîchement préparées, de moins de 8-10 jours (tabl. 12),

TABLEAU 12

Solutions tampons utilisées pour les dosages enzymatiques

(Quantités pour un litre de solution)

Substrat dosé	pH	Molarité	Constituants principaux	EDTA-Na_2H_2 (g)	Constituants annexes	Ajustement du pH
Acide pyruvique	6,8	0,2	35,8 g Na_2HPO_4, 12 H_2O 23,6 g KH_2PO_4	7,4	—	H_3PO_4 et NaOH
Ac. α-cétoglutarique	7,6	0,2	58,4 g Na_2HPO_4, 12 H_2O 3,8 g KH_2PO_4	7,4	11,5 g $NH_4H_2PO_4$	H_3PO_4 et NaOH
Acide oxalacétique	7,6	0,4	59,6 g triéthanolamine 34 ml HCl pur	14,8	—	NaOH
Dihydroxyacétone	7,15	0,05	7,5 g triéthanolamine 4 ml HCl 2 N	—	0,4 g $MgCl_2$, 12 H_2O	HCl
Dihydroxyacétone-phosphate	7,6	0,4	59,6 g triéthanolamine 34 ml HCl	14,8	—	NaOH

Dilution.

Nous verrons que les vins renferment environ de 0,2 à 2 mMol par l d'acide pyruvique et d'acide α-cétoglutarique, mais moins de 0,1 mMol par l des autres corps envisagés ici. Pour les deux premiers acides, il suffit d'ajouter 20 à 100 µl de vin ou de moût (décoloré par le charbon s'il s'agit de vin rouge) à 2 ml de solution tampon dans la cuve à colorimétrer. Il y a dilution sans importante modification de pH. Par contre, pour les trois derniers dosages, il est nécessaire d'amener l'échantillon au pH du dosage avant de le mélanger à la solution tampon. L'addition directe, parfois utilisée donne de mauvais résultats, le pH du milieu étant alors beaucoup trop bas à cause du fort pouvoir tampon du vin. Après ajustement du pH (ou à la rigueur une simple neutralisation, car le pouvoir tampon du vin devient faible vers pH 7,0) on ajoute 0,5, 1 ou 2 ml d'échantillon à la solution tampon. Il est alors souvent nécessaire d'effectuer le zéro optique sur ce même mélange sans enzyme ni coenzyme.

Exécution du dosage.

Les dosages sont réalisés d'après les schémas du tableau 13. Pour les dosages 1, 2, 3 et 4 on opère ainsi :

2 ml de solution tampon,
+ v ml d'échantillon neutralisé si nécessaire,
+ 50 µl de solution de NAD-H ; on agite.

Soit V_1 ce volume initial ; on mesure DO_1 à 340 mµ.
+ 50 µl de solution d'enzyme (LDH, GLDH, MDH ou GDH) ; on agite.

Soit V_2 ce volume final. C'est le temps zéro. On mesure la densité optique à 340 mµ au bout de 1, 3 et 6 minutes et on détermine DO_2 par extrapolation graphique ou par calcul.

Pour le dosage 5, il est nécessaire d'effectuer la phosphorylation de la dihydroxyacétone avant sa réduction. On opère alors de la façon suivante :

2 ml de solution tampon,
+ v ml d'échantillon neutralisé,
+ 50 µl de solution de ATP,
+ 50 µl de solution de GDH,
+ 50 µl de solution de NAD-H ; on agite ce volume initial V_1 et on mesure DO_1,
+ 50 µl de GK ; on agite ce volume final V_2 : c'est le temps zéro.

On procède ensuite comme précédemment. Dans chaque cas, on effectue un essai à blanc en remplaçant l'échantillon par un même volume d'eau.

Calculs.

Comme nous l'avons vu, on a :

$$\Delta \text{ DO} = \left(\text{DO}_1 \times \frac{V_1}{V_2}\right) - \text{DO}_2 \pm \delta \text{ DO}.$$

δ DO est la variation de densité optique obtenue dans l'essai à blanc.
puis :

$$q = \frac{\Delta \text{ DO} \times V_2 \times \text{PM}}{\varepsilon \times d}$$

q est la quantité de substrat dans la prise d'essai.
Sachant que $\varepsilon_{340} = 6{,}22 \times 10^6$ cm²/mol et $d = 1$ cm, on a :

$$q \text{ µg par prise d'essai} = \frac{\Delta \text{ DO} \times V_2 \text{ ml} \times \text{PM}}{6{,}22}$$

$$q = \Delta \text{ DO} \times V_2 \times \text{PM} \times 0{,}161.$$

Pour un dosage donné, PM × 0,161 est constant et il peut en être de même de v, V_1 et V_2. On a alors simplement :

$$Q \text{ mg par l} = \Delta \text{ DO} \times k$$

et par un choix convenable des valeurs de v, V_1 et V_2, en fonction de PM, on peut donner à k une valeur simple permettant de simplifier les calculs.

TABLEAU 13

Schéma des dosages enzymatiques de divers constituants du vin

	Produit à doser	Enzymes utilisés	pH	Produit formé	Observations
1°	Pyruvate $CH_3—CO—COO^-$	LDH lacticodéshydrogénase	6,8 (phosphate)	lactate $CH_3—CHOH—COO^-$	
2°	α-cétoglutarate $COOH—CH_2—CH_2—CO—COO^-$	GLDH glutamatedéshydrogénsae	7,6 (phosphate)	glutamate $COOH—CH_2—CH_2—CH(NH_2)(COO^-)$	avec excès de NH_4^+
3°	Oxalacétate $COOH—CH_2—CO—COO^-$	MDH malicodéshydrogénase	7,6 (triéthanolamine)	malate $COOH—CH_2—CHOH—COO^-$	
4°	Dihydroxyacétone phosphate $CH_2OH—CO—CH_2—O—PO_3H^-$	GDH glycérophosphatedéshydrogénase	7,6 (triéthanolamine)	glycérol-phosphate $CH_2OH—CHOH—CH_2—O—PO_3H^-$	
5°	Dihydroxyacétone $CH_2OH — CO — CH_2OH$	GK + ATP glycérokinase + adénosine triphosphate puis id. à 4	7,15 (triéthanolamine)	dihydroxyacétone-phosphate $CH_2OH—CO—CH_2—O—PO_3H^-$ puis *id.* à 4	en présence de Mg^{++}

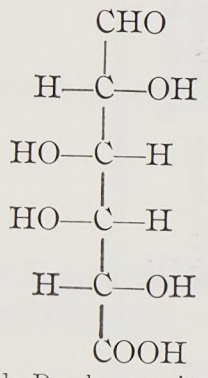
On peut effectuer les mesures à 334 ou 366 mμ (raies d'émission de la lampe à mercure dont sont équipés certains photomètres). On a alors $\varepsilon_{334} = 6{,}0 \times 10^6 cm^2/mol$ et $\varepsilon_{366} = 3{,}3 \times 10^6\ cm^2/mol$, ces valeurs augmentant lorsque la température s'abaisse.

3. *Conclusions*

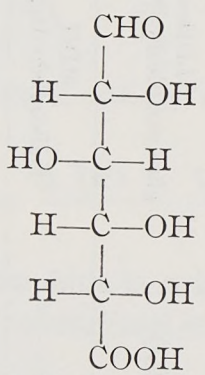
Ces méthodes nouvelles de dosage, spécifiques, très sensibles, simples, rapides, permettent d'effectuer plusieurs dizaines de dosages par jour de plusieurs corps peu abondants ou fragiles existant dans les vins et les moûts. A l'aide des modes opératoires indiqués on obtient, pour un seul dosage, un écart inférieur à 5 p. 100 ou 5 mg par l pour l'acide pyruvique ou l'acide α-cétoglutarique et un écart inférieur à 0,5 mg par l pour les autres corps étudiés. Constituant à la fois une méthode d'identification et de dosage, elles apparaissent promises à un grand avenir en œnologie analytique pour la détermination de composés peu concentrés et peu abondants, mais difficiles à séparer. L'abondante littérature récente sur ces sujets confirme leur intérêt.

IV — Caractérisation et dosage des acides uroniques dans les moûts et les vins

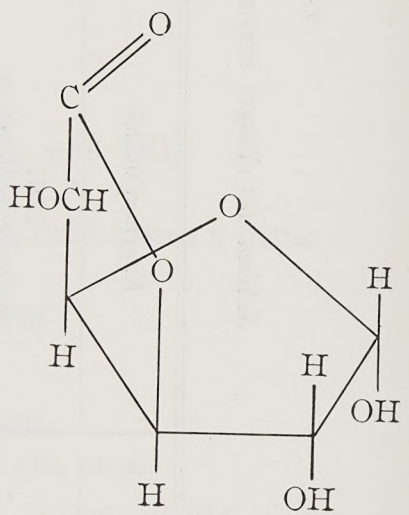
De 1929 à 1964, de nombreux travaux ont signalé la présence plus ou moins constante d'acides uroniques dans les moûts et les vins. Il s'agit de l'acide D-galacturonique et de l'acide D-glucuronique (anciennement appelé glycuronique) ; ces acides ne diffèrent entre eux que par la position d'une fonction alcool secondaire en C_4 :



Acide D-galacturonique



Acide D-glucuronique



3-6 α D-furanoglucurone (ou glucurone)

Ces acides isomères ont de nombreux caractères communs et peu de propriétés différentes. Ils peuvent exister à des concentrations relativement élevées ; ils peuvent occuper alors une place importante dans l'extrait du vin et jouer un rôle remarquable à divers points de vue. Il s'imposait donc de disposer de méthodes satisfaisantes de caractérisation et de dosage. Nous décrirons celles que nous avons mises au point après les avoir justifiées par l'étude des propriétés générales de ces deux acides sur lesquelles elles sont basées.

1. *Propriétés générales des acides uroniques*

Outre leurs caractères d'acides, les acides glucuronique et galacturonique présentent de nombreuses propriétés des sucres ; on appelle parfois les acides uroniques les « sucres-acides ». Ils réduisent tous les deux l'iode à froid, en milieu alcalin avec la même intensité que le glucose et nous avons utilisé cette propriété pour doser l'acide galacturonique en solution simple (BLOUIN, BARTHE, 1963). De même ils réduisent à chaud les liqueurs cuproalcalines. Cette propriété, connue de VENTRE (1939), a été récemment examinée par DIMOTAKI-KOURAKOU (1962, 1963, 1964), qui en a montré l'importance dans l'analyse des vins à faible teneur en sucres réducteurs. Dans certains de ces vins les acides uroniques peuvent en effet constituer la fraction essentielle des « sucres réducteurs dosés », faussant ainsi l'interprétation des risques de refermentation, car les acides uroniques sont infermentescibles. En conséquence DIMOTAKI-KOURAKOU a établi une méthode de dosage des sucres vrais des vins (hexoses et pentoses), qui permet en même temps d'apprécier le taux d'acides uroniques. Cette méthode a été retenue comme méthode officielle de dosage des sucres par l'Office International de la Vigne et du Vin et par la législation française.

Les acides uroniques sont dextrogyres, mais leur pouvoir rotatoire inférieur à celui du glucose ne saurait expliquer, contrairement à certaines affirmations, les pouvoirs rotatoires anormalement élevés de certains vins.

Autre propriété importante, les acides uroniques chauffés en milieu acide se décomposent en gaz carbonique et en furfural ou ses dérivés. Cette réaction peu spécifique est cependant la réaction de base de la plupart des méthodes de dosage des acides uroniques qui opèrent, soit par mesure du gaz carbonique formé, soit par dosage du furfural, soit le plus souvent par l'intermédiaire de réactions colorées du furfural ou de ses dérivés, obtenues à l'aide de divers réactifs ajoutés au milieu analysé.

Enfin, et c'est une des rares différences importantes entre acide glucuronique et acide galacturonique, l'acide glucuronique a une forte tendance à former une γ-lactone, la glucurone (ou 3-6 α D-furanoglucurone), qui représente environ 20 p. 100 de la teneur totale en acide dans une solution aqueuse neutre. Cette lactonisation est supprimée en milieu alcalin et augmentée en milieu acide. Elle est alors susceptible de permettre la caractérisation de l'acide glucuronique, comme nous le verrons plus loin.

Ce rappel rapide des caractéristiques générales des acides uroniques montre comment on peut envisager de les mettre en évidence et de les doser dans les moûts et les vins. Ces milieux étant toujours riches en sucres et acides divers, il importe d'isoler les acides uroniques avant de les caractériser ou de les doser.

2. *Isolement des acides uroniques*

Les acides glucuronique et galacturonique présentant certaines propriétés des sucres sont faciles à caractériser globalement en mélange avec d'autres acides non sucres, tels les acides organiques des vins ; leur caractérisation séparée est alors simplifiée.

On peut précipiter les acides uroniques par le sous-acétate de plomb en milieu ammoniacal et laver le précipité afin d'éliminer les sucres entraînés. L'examen chromatographique sur papier des précipités montre qu'il reste habituellement des traces de sucres. Cette technique est donc à rejeter. De même l'extraction de l'acide glucuronique par le butanol, qui est utilisé pour sa séparation dans les urines, est inapplicable aux moûts et aux vins beaucoup plus riches en sucres.

On obtient actuellement les meilleures séparations entre les sucres et les acides uroniques à l'aide de résines échangeuses d'anions. Parmi les nombreuses possibilités proposées, nous avons obtenu d'excellents résultats en employant des échangeues d'anions base forte (Dowex 2, IRA-400), sous forme saline ($CH_3—COO^-$, $H—COO^-$). La résine base forte assure une bonne fixation de tous les acides et l'élution par 1 ion acétate ou formiate évite l'altération des sucres des vins, contrairement à l'élution par les ions OH^- ou même CO_3^{--}, comme nous avons pu le vérifier par chromatographie sur papier, en traitant des solutions synthétiques simples de divers sucres et divers acides.

TABLEAU 14

Recouvrement des acides uroniques totaux dans les vins

(Teneurs en mg par litre)

		Valeurs individuelles	Valeur moyenne	Recouvrement après addition	
					(%)
Vin n° 1	1re colonne d'échangeurs	800, 800, 860	820	—	—
	2e colonne d'échangeurs	860, 870, 860	860	—	—
	3e colonne d'échangeurs	850, 880, 880	870	—	—
Vin n° 2		540, 500	520	—	—
	+ 500 acide glucuronique .	1 100, 930, 1 110	1 040	520	104
	+ 1 000 acide glucuronique	1 700, 1 350, 1 350	1 470	950	95

Comme nous l'avons déjà indiqué (BLOUIN, PEYNAUD, 1963), nous avons adopté pour la séparation des colonnes de résines Dowex 2 sous forme formiate avec élution par l'acide formique. Le tableau 14 justifie cette méthode en montrant la bonne reproductibilité des résultats et le bon recouvrement des quantités d'acides uroniques ajoutées à deux vins blancs doux ayant 30 et 50 g de sucres réducteurs par l.

Outre la séparation globale des acides uroniques considérés ici, il est possible de les séparer l'un de l'autre sur colonne d'échangeurs d'ions (KHYM, DOHERTY, 1952 ; ROUDIER, EBERHARD, 1955). Les méthodes proposées sont malheureusement longues. Nos manipulations étaient terminées lorsque nous eûmes connaissance de la méthode, plus simple, de GEORGEAKOPOULOS et coll. (1963) et nous n'avons pu l'essayer. D'ailleurs nous disposions alors d'autres techniques de séparation et d'une méthode de dosage différentiel de l'acide glucuronique et de l'acide galacturonique en mélange, que nous allons étudier maintenant.

3. *Séparation chromatographique des acides galacturonique et glucuronique*

En dépit de nombreuses recherches on ne connaissait pas, lorsque nous avons abordé ces recherches, de séparation chromatographique correcte de l'acide glucuronique d'avec l'acide galacturonique ; seule la glucurone se sépare facilement d'avec les acides. En reprenant les techniques habituelles de séparation, nous n'avons pas obtenu de résultat satisfaisant, malgré l'essai de plusieurs dizaines de solvants à base d'alcools, d'éther, d'acétate d'éthyle, de phénol ou de pyridine. Voulant mettre à profit les propriétés conférées par les fonctions polyol et aldéhydiques des acides uroniques, nous avons essayé l'imprégnation du papier chromatographique à l'aide d'acide borique, de molybdate d'amomnium, d'hydroxylamine, de phénylhydrazine, de semi-carbazide, de *m*-phénylène diamine et de sulfite de sodium ; dans tous les cas les résultats ont été médiocres et inexploitables. La chromatographie sur couches minces de silice imprégnées ou non d'acétate de sodium ou d'acide borique ne nous a pas permis, non plus, de séparation satisfaisante.

Comme solution provisoire, nous avons adopté le solvant isopropanol-pyridine-eau-acide acétique, 8-8-4-1 indiqué par GORDON et coll. (1962). Il assure une séparation approximative des deux acides uroniques : Rf de l'acide glucuronique 0,28 et de l'acide galacturonique 0,22, sur papier Whatman n° 4.

Par contre, et à notre connaissance c'est la première utilisation de cette technique en œnologie analytique, nous avons obtenu une séparation très nette des deux acides par chromatographie sur papier échangeurs d'ions. L'étude systématique de quatre papiers échangeurs d'ions en employant divers solvants, nous a permis de choisir les meilleures combinaisons ; les résultats sont reproduits dans le tableau 15.

TABLEAU 15

Séparation chromatographique des acides uroniques avec différents papiers échangeurs d'ions Amberlite

Valeurs de Rf × 100 avec trois solvants différents :

1. Méthanol 50° saturé par du sulfite de sodium.
2. Acétone 50 p. 100 dans l'eau saturée par du borate de sodium.
3. Éthanol — eau — acide acétique 85-10-5 (OERTEL, 1962).

Papier	SB – 2			WB – 2			SA – 2			WA – 2		
Résine incorporée	IRA – 400 Cl^-			IR – 4 B OH^-			IR – 120 Na^+			IRC – 50 H^+		
Solvant	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Durée migration p. 20cm (h)	2	2	2	3	3	3, 30	3	3	3	3, 30	4	4, 30
Acide glucuronique	22	5	10	0	—	49	61	54	12	80	81	37
Glucurone.....	22	5	19	0	—	49	61	84	13	87	95	88
Acide galacturonique	26	5	10	0	22	41	45	45	6	75	77	28

Les spots obtenus sont parfois très allongés et représentent 10 à 20 p. 100 de la distance de migration ; il est donc nécessaire d'avoir une forte différence de valeurs de Rf pour obtenir une bonne séparation. Nous avons adopté le papier SA-2 avec le solvant Méthanol 50° saturé par le sulfite de sodium ; les spots sont compacts et bien séparés. Le papier étant imprégné d'un échangeur de cations acide fort (Amberlite IR-120), il y a sans doute lactonisation complète de l'acide glucuronique, malgré l'alcalinité du solvant. L'acide et la lactone ont le même Rf. Ainsi cette technique réalise en une seule opération la lactonisation et la séparation de l'acide glucuronique.

Nos manipulations étaient terminées, lorsque nous eûmes connaissance de la méthode utilisée par DIMOTAKI-KOURAKOU (1964), qui réalise la lactonisation de l'acide glucuronique en milieu acétique et procède ensuite à la séparation par chromatographie sur papier. Cette technique confirme nos résultats sur les possibilités de séparation de l'acide glucuronique et de l'acide galacturonique, mais nous préférons l'emploi des papiers échangeurs d'ions dont la première utilisation en analyse des vins se révèle prometteuse.

Après leur séparation chromatographique, les acides uroniques sont révélés à l'aide de réactifs appropriés. Parmi une longue liste de révélateurs possibles (réactifs des acides, des polyols, des sucres ou des aldéhydes), nous en avons retenus quatre, soit pour leur facilité d'emploi (phtalate acide d'aniline), leur spécificité à l'égard des acides uroniques (naphtorésorcinol), soit pour leur sensibilité (*o*-phénétidine, N-naphtyl éthylène diamine). Ils sont tous appliqués en pulvérisation par courant d'air ; ce procédé évite la formation de traînées qui apparaissent souvent par trempage. Ils sont également applicables sur papiers ordinaires ou sur papiers échangeurs d'ions ; la sensibilité est légèrement diminuée dans le second cas.

Après avoir réalisé la séparation chromatographique complète des acides glucuronique et galacturonique, il devient possible d'en envisager le dosage séparé.

4. *Dosage des acides uroniques*

On peut utiliser le pouvoir réducteur des acides uroniques et les doser comme des sucres dans le mélange d'acides isolés sur colonne d'échangeurs d'ions. Si l'on compare les résultats de KERTESZ (1935), qui a utilisé le dosage par la méthode de Bertrand, avec les résultats habituels concernant le glucose, on constate que, à poids égal, l'acide glucuronique possède un pouvoir réducteur équivalent à 90 p. 100 et l'acide galacturonique à 70 p. 100 environ de celui du glucose. La réductimétrie permet donc la détermination d'un « indice d'acides uroniques », mais elle ne permet pas un dosage précis de leur somme et encore moins un dosage individuel. Cette méthode n'est valable que pour le dosage des sucres réducteurs vrais.

D'un autre côté, la décarboxylation des acides uroniques, à chaud en milieu chlorhydrique, avec mesure du gaz carbonique dégagé ou du furfural apparu est complexe, peu spécifique et peu sensible ; elle est réservée à l'étude des matières pectiques.

Le plus souvent on dose les acides uroniques par une méthode colorimétrique basée sur une réaction entre les produits de dégradation des acides uroniques chauffés en milieu acide et divers phénols tels l'orcinol, le phloroglucinol, l'α-naphtol, le 1-3 naphtalènediol (ou naphtarésorcinol), le 2-7 naphtalènediol, le *p*-oxyphényle ou

encore la benzidine, l'anthrone, l'*o*-nitrobenzène et le carbazole. On mesure parfois plus simplement la densité optique du milieu chauffé en milieu acide, sans réactif ajouté, mais pour des raisons de spécificité et de sensibilité, on emploie plus couramment la réaction au naphtorésorcinol (réaction de LEFÈVRE-TOLLENS) ou au carbazole (réaction de DISCHE).

La méthode LEFÈVRE-TOLLENS (1907) utilise, après extraction à l'éther, la mesure de la coloration mauve donnée par la réaction entre les acides uroniques et le naphtorésorcinol en milieu chlorhydrique. Malgré diverses modifications, cette méthode demeure longue et délicate ; elle ne permet qu'un dosage global des acides glucuronique et galacturonique.

Après essais, nous l'avons rejetée au profit de la méthode de DISCHE (1947). Cet auteur a montré la bonne spécificité de la réaction avec les acides uroniques ; il n'y a aucune réaction entre le carbazole en milieu sulfurique et les acides pyruvique, acétoacétique, lactique, malique, succinique, acétique, ascorbique, hydroxypyruvique, mucique et 2-cétohexonique à des concentrations très supérieures à celles des acides uroniques. Cette spécificité, jointe à une bonne sensibilité qui permet de doser 10 à 100 µg d'acide par prise d'essai, nous ont fait adopter cette méthode. Nous avons d'abord recherché les conditions optimales d'utilisation de cette réaction.

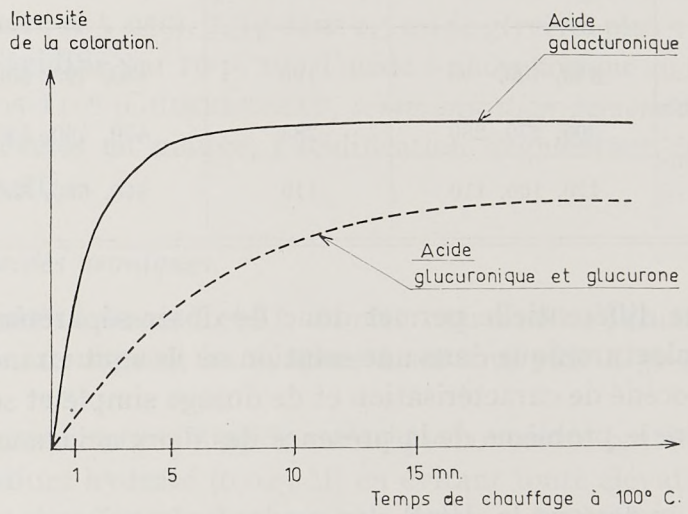


FIG. 15. — *Influence du temps de chauffage à 100°C sur l'intensité de la coloration formée par les acides uroniques au cours de la réaction de* DISCHE.

L'allure précise de ces courbes peut varier légèrement d'un dosage à l'autre.

Par chauffage des acides uroniques en milieu sulfurique concentré, puis addition de carbazole, il apparaît dans le milieu une coloration rouge violacée qui résulterait de la condensation du carbazole avec le carboxy-5-furfural. La vitesse d'apparition, l'intensité et la stabilité de la coloration varient avec l'intensité et la durée du chauffage en milieu sulfurique, le moment de l'addition du carbazole, la durée de réaction après cette addition ; la présence de borate de sodium dans le milieu analysé intervient également. Nous avons fait l'observation que la vitesse de réaction varie également avec l'acide uronique considéré. La figure 15 montre l'évolution de la coloration pour les deux acides en fonction du temps de chauffage très bref, d'une durée d'une minute, l'acide galacturonique n'intervient pratiquement pas alors que pour un chauffage prolongé, de 15 minutes par exemple, on dose la somme des deux acides. La

mesure de l'intensité colorante développée sur deux échantillons dont l'un est chauffé 1 minute et l'autre 15 minutes permet de calculer la teneur des deux acides.

Le tableau 14 correspondait au dosage des acides uroniques totaux. Le tableau 16 indique la fidélité et la précision des résultats obtenus et donne des exemples du dosage séparé des deux acides uroniques.

Il ressort de l'examen de ces tableaux que l'on peut déterminer les acides glucuronique et galacturonique dans les vins à 50 mg par l près, soit à 10 p. 100 près environ, selon la teneur absolue en acides. Cette précision est supérieure à celle que l'on peut espérer obtenir par chromatographie sur papier. Elle suffit largement aux besoins de notre travail car on se souvient que les acides uroniques ne combinent que faiblement l'anhydride sulfureux.

TABLEAU 16

Recouvrement des différents acides uroniques dans un vin

(Teneurs en mg par l)

	Acide glucuronique		Acide galacturonique	
	Valeurs trouvées	Moyenne	Valeurs trouvées	Moyenne
Vin nature	130, 100, 90	106	450, 490, 500	476
Vin + 200 d'acide glucuronique	300, 270, 280	283	470, 460, 510	480
Vin + 200 d'acide galacturonique	120, 100, 110	110	640, 660, 650	650

Cette technique différentielle permet donc de doser séparément l'acide glucuronique et l'acide galacturonique dans une solution où ils sont en mélange. Elle constitue à la fois un procédé de caractérisation et de dosage simple et sensible. Elle nous a permis de résoudre le problème de la présence des deux acides uroniques dans les moûts et les vins.

Nous donnons ci-dessous le détail des modes opératoires.

5. *Techniques de caractérisation et de dosage des acides uroniques*

Séparation des acides.

On fait passer, goutte à goutte, 5 ml de moût ou de vin sur une colonne de 15 ml environ de Dowex 2 × 8 (50-100 mesh) sous forme formiate. On rince abondamment (200 à 300 ml d'eau). On élue par 250 ml d'acide formique 6 N que l'on recueille. Après rinçage à l'eau jusqu'à neutralité, la colonne est prête à resservir deux ou trois fois avant de subir un cycle de régénération par la soude N.

Chromatographie des acides uroniques.

Une fraction aliquote de l'éluat formique homogénéisé (50 ml par exemple) est évaporée sous vide à 30-40°C jusqu'à siccité. Le résidu repris par un minimum d'eau (200 µl par exemple) est chromatographié. On utilise soit la chromatographie ascen-

dante sur papier Whatman n° 4 avec le solvant isopropanol-pyridine-eau-acide acétique 8-8-4-1 v/v, soit la chromatographie ascendante sur papier échangeur d'ions Amberlite SA-2 avec le solvant méthanol 50° saturé par le sulfite de sodium. Après révélation, par comparaison avec des spots contenant des quantités connues d'acide uronique, on peut apprécier la teneur en tel ou tel acide de l'échantillon étudié.

Liste des révélateurs. — Phtalate acide d'aniline. On broie 16,6 g d'acide *o*-phtalique dans 30 ml d'eau, on ajoute 500 ml d'acétate d'éthyle et 9,3 g d'aniline ; on maintient l'ébullition sous reflux jusqu'à limpidité et on ajuste à 1 litre. Ce réactif, plus volatil que ceux habituellement préconisés, se conserve bien en flacons bruns et révèle l'acide glucuronique en brun rougeâtre et l'acide galacturonique en brun jaunâtre après chauffage à 105-110°C.

Naphtorésorcinol à 1 p. 1000 dans l'éthanol contenant 1 p. 100 d'acide trichloracétique, par mélange extemporané des solutions alcooliques de naphtorésorcinol et d'acide. On chauffe à 70-80°C seulement, en atmosphère humide ; les acides uroniques se révèlent alors de façon très spécifique en bleu sur fond blanc virant au rose.

O-phénitidine à 1 p. 100 dans l'éthanol contenant 10 p. 100 d'acide trichloracétique (Arni et Percival, 1951). Ce réactif est très sensible mais se conserve mal et est très toxique.

Dichlorhydrate de N (1-naphtyl) éthylène diamine (par exemple produit East man 4 835 ou Fluka A 5 959). 1,3 g dans 2,5 ml de glycérol plus 5 ml d'eau et acétone q. s. p. 50 ml. On acidifie par 10 p. 100 d'acide *o*-phosphorique au moment de l'emploi et on chauffe à 105-110° (Guimberteau, *communication personnelle* 1964). Les acides uroniques sont révélés en mauve, l'acidification augmentant considérablement la sensibilité du réactif.

Colorimétrie des acides uroniques.

Dans deux tubes à essais I et II, on met 1 ou 2 ml de l'éluat (selon la quantité présumée d'acides uroniques), on évapore à sec sous vide à 30-40°C et on reprend par 1 ml d'eau.

On verse doucement 6 ml d'acide sulfurique concentré contenant 9,54 g par l de tétraborate de sodium hydraté (0,025 M) en évitant toute élévation de température par agitation des tubes à essais dans un bain de glace fondante. On ajoute 0,1 ml de solution à 0,1 p. 1 000 de carbazole dans l'alcool à 95° ; on agite.

On porte le tube I au bain-marie bouillant pendant exactement une minute, on agite et on le conserve dans un bain de glace fondante. On porte le tube II au bain-marie bouillant pendant 15 minutes et on opère de même.

Au bout de 2 à 3 heures, on colorimètre chaque tube à 527 mμ. En comparant chaque fois à une gamme étalon allant de 25 à 100 μg par ml, établie dans les mêmes conditions avec de l'acide glucuronique ou de l'acide galacturonique monohydraté et un témoin sans acide uronique, on obtient pour chaque échantillon deux valeurs de densités optiques DO_2 et DO_1. On a alors les équations suivantes faciles à résoudre :

$$DO_1 = a_1 A + b_1 B,$$

et

$$DO_2 = a_2 A + b_2 B.$$

A et B sont les quantités, en μg, d'acides glucuronique et galacturonique dans la prise d'essai et a_1 et a_2, b_1 et b_2 les densités optiques correspondant à 1 μg d'acides

glucuronique et galacturonique pour un chauffage de 1 minute (tube I) ou de 15 minutes (tube II). On peut souvent négliger a_1, DO_1 correspondant alors à l'acide galacturonique seul, et on peut calculer graphiquement A et B.

Connaissant les quantités d'acides par prise d'essai, il est aisé de déterminer leurs concentrations dans l'échantillon de départ en tenant compte des dilutions successives.

Remarques. — Purification de l'alcool. Comme il est indiqué par LYNCH et coll. (1957), on fait bouillir pendant 24 heures sous reflux un litre d'éthanol 95-100° pour analyse en présence de 4 g de zinc en poudre et de 4 ml d'acide sulfurique au demi. On distille, puis on redistille sur 4 g de poudre de zinc et 4 g de potasse caustique par litre d'alcool.

— Les échantillons d'acides uroniques utilisés dans la préparation de la gamme sont préservés de l'humidité en les conservant sous vide en présence de chlorure de calcium.

— Il est extrêmement important d'éviter tout apport de fer au cours des manipulations ; le carbazole donnerait une intense coloration verte rendant toute mesure impossible.

6. *Conclusions*

L'examen des propriétés générales des acides glucuronique et galacturonique permet d'orienter utilement l'étude de leur séparation. Ils peuvent être séparés d'avec les sucres par fixation sur un échangeur d'anion-base forte, sous forme faiblement basique, suivie d'une élution.

Ainsi isolés ils peuvent être chromatographiés. On ne les sépare que grossièrement l'un de l'autre par chromatographie sur papier ordinaire mais nous n'avons pu les séparer parfaitement l'un de l'autre par chromatographie sur papier échangeur d'ions. C'est, à notre connaissance, la première utilisation de cette technique en œnologie analytique et la première séparation chromatographique simple des acides glucuronique et galacturonique.

D'un autre côté, l'étude systématique de la réaction colorée de DISCHE, ou réaction des acides uroniques en milieu sulfurique avec le carbazole, nous a permis de les doser séparément lorsqu'ils sont en mélange. On utilise leur différence de réactivité vis-à-vis du carbazole par des mesures colorimétriques effectuées après 1 minute et après 15 minutes.

La mise au point de ces différentes techniques résout de façon satisfaisante la caractérisation et le dosage séparé des acides glucuronique et galacturonique dans les moûts et les vins.

V — Dosage de l'acide glyoxylique

L'acide glyoxylique a été plusieurs fois signalé dans les moûts et les vins à des doses variables ; pour vérifier sa présence nous avons entrepris d'en mettre au point le dosage.

1. *Séparation de l'acide glyoxylique*

L'acide glyoxylique, ou éthanaloïque, ou semi-aldéhyde oxalique, est à l'état pur un liquide épais, souvent hydraté, de formule CHO—COOH, de poids molécu-

laire 74 ; il est généralement commercialisé sous forme de sel de sodium. C'est un acide fort (pK = 1,32).

D'après les derniers travaux de MESTRES (1953) et de JAULMES (1963), l'acide glyoxylique est beaucoup moins volatil que ne l'indiquaient les premières mesures. Par distillation directe, on sépare environ 1 p. 1 000 de la quantité mise en jeu en recueillant 9/10 du volume et par entraînement à la vapeur on sépare environ 1 p. 100 de cette quantité en recueillant 20 fois le volume initial.

La distillation est donc une mauvaise méthode de séparation de l'acide glyoxylique et la précipitation convient mieux. On utilise habituellement l'insolubilité de son sel de plomb en milieu ammoniacal ; on libère ensuite l'acide par action de l'acide sulfhydrique ou d'un échangeur de cations. Cette précipitation n'est pas spécifique de l'acide glyoxylique, mais elle réalise une première concentration et permet ensuite l'application de divers dosages spécifiques.

2. *Caractérisations et dosages*

On connaît de nombreuses réactions données par l'acide glyoxylique. Citons par exemple les réactions colorées avec le résorcinol, le naphtorésorcinol, le tryptophane en milieu sulfurique ou le pyrogallol ; on peut utiliser encore son oxydation en acide oxalique, sa réduction chimique ou enzymatique en acide glycolique, sa décarboxylation ou sa combinaison avec le sulfite de sodium. En fait ces réactions sont peu sensibles, peu spécifiques et l'acide glyoxylique est généralement déterminé par l'oxydation de sa phénylhydrazone par le ferricyanure de potassium. En milieu acide l'acide glyoxylique se condense avec la phénylhydrazine en phénylhydrazone dont l'oxydation donne un produit coloré en rouge groseille susceptible d'être colorimétré. C'est la réaction de Schryver, adaptée à l'acide glyoxylique par Fosse et Hieulle.

Schryver caractérisait le méthanal en le faisant réagir simultanément avec la phénylhydrazine et le ferricyanure de potassium en milieu chlorhydrique. Fosse et Hieulle montrèrent qu'en chauffant le mélange acide-phénylhydrazine avant de le traiter au ferricyanure, l'acide glyoxylique donnait une réaction rouge le différenciant du méthanal qui ne donne alors qu'une coloration jaune. Depuis, la bonne spécificité de cette réaction a été reconnue particulièrement par MAC FADDEN et HOWES (1960). Seul le glyoxal interfère sensiblement et augmente la réaction de 14 p. 100 à doses équivalentes ; dans les mêmes conditions le méthanal n'interfère que pour 6 p. 100, l'acide pyruvique pour 4 p. 100 et l'acide α-cétoglutarique pour moins de 1 p. 1 000. Nous avons nous même observé l'absence d'interférence des glucose, fructose, arabinose, acides tartrique, glucuronique, pyruvique, α-cétoglutarique, oxalacétique. Seuls le glyoxal et l'aldéhyde glycolique réagissent aux fortes concentrations.

3. *Conditions du dosage*

On chauffe la prise d'essai contenant l'acide glyoxylique en présence de chlorhydrate de phénylhydrazine ; on refroidit, acidifie par l'acide chlorhydrique concentré et oxyde par le ferricyanure de potassium : il se développe une coloration rouge groseille que l'on mesure au photomètre, en comparant à un témoin sans acide glyoxylique et à une gamme obtenue dans les mêmes conditions.

L'essai systématique des différents facteurs du dosage nous a montré que :

1. Le maximum d'absorption du colorant formé se situe à 520 mμ.

2. La coloration maximale est obtenue pour une concentration de 15 à 20 $\times 10^{-3}$ M en phénylhydrazine et de 12,5 $\times 10^{-3}$ M en ferricyanure de potassium.

3. L'addition d'acide oxalique régularise la réaction sans en modifier sensiblement l'intensité.

4. La coloration maximale obtenue varie fortement avec la durée et l'intensité du chauffage au cours du premier temps de la réaction. On obtient les meilleurs résultats (intensité et reproductibilité) en plongeant les tubes à réaction pendant une minute exactement dans un bain-marie bouillant.

5. La coloration rouge qui apparaît après l'addition de ferricyanure diminue sensiblement (environ de 15 p. 100 au bout d'une heure). Toutes les mesures doivent donc être effectuées au bout d'un même temps d'attente, en général de 5 ou 7 minutes.

6. On dose avec précision 1 à 15 μg (soit 0,01 à 0,2 μ M) par prise d'essai de 5 ml et on décèle environ 0,5 μg.

4. *Mode opératoire du dosage*

On neutralise 5 à 10 ml de vin, décoloré si nécessaire par un minimum de charbon, par l'ammoniaque au tiers avec le rouge de méthyle comme indicateur externe. On ajoute 1 ml de sous-acétate de plomb filtré, on agite et on laisse réagir quelques minutes. On centrifuge et on lave deux fois le précipité qui est alors repris par un minimum d'échangeur de cations sous forme H^+ (Dowex 50, Amberlite IR 120) jusqu'à élimination complète du plomb. On filtre, on rince la résine et on ajuste à un volume connu, 20 ou 25 ml par exemple.

Pour la préparation d'une gamme étalon on traite comme indiqué ci-dessus une solution commerciale d'acide glyoxylique ou de glyoxalate de sodium pour le purifier et on le dose par la « méthode au bisulfite » (cf. plus loin). Par dilution convenable, on prépare une solution de titre exactement connu à environ 2,5 à 3 mg par l, puis une gamme contenant 0, 1, 2, 3, 4 et 5 ml de cette solution, soit environ de 0 à 15 μg d'acide glyoxylique pour 5 ml.

On mélange dans un tube à essai 5 ml de solution à doser convenablement diluée, 1 ml d'acide oxalique M et 1 ml de solution fraîche, préparée depuis moins de 8 à 10 h, de chlorhydrate de phénylhydrazine à 1 p. 100. On plonge pendant une minute exactement dans un bain d'eau bouillante, puis on refroidit dans un bain de glace fondante. Ensuite on ajoute 4 ml d'acide chlorhydrique fumant et 1 ml de solution de ferricyanure de potassium à 5 p. 100, fraîchement préparée. On laisse réagir à la température ambiante et on colorimètre après 5 ou 7 minutes.

Par comparaison avec la gamme-étalon établie dans les mêmes conditions, on détermine la teneur en acide glyoxylique de la prise d'essai.

5. *Titrage direct de la solution simple d'acide glyoxylique*

Selon la réaction ci-dessous l'acide glyoxylique se combine au sulfite de sodium en libérant de la soude. A pH 9,5 la réaction est quantitative et se prête bien au dosage :

$$CHO—COONa + Na_2SO_3 + H_2O \rightarrow COONa—CHOH—SO_3Na + NaOH.$$

Un équivalent d'acide libère un équivalent de soude. On ajuste un volume de solution contenant 0,5 à 1 méq. d'acide glyoxylique à pH 9,5, on ajoute 50 ml de sulfite de sodium à pH 9,5 ; on titre la soude libérée par l'acide sulfurique N/10, jusqu'à pH 9,5.

VI — Méthodes analytiques diverses

Nous avons analysé les vins à l'aide des techniques habituelles, généralement indiquées dans le traité d'analyses de RIBÉREAU-GAYON et PEYNAUD.

Degré alcoolique : par distillation et densimétrie ou par ébulliométrie selon la précision souhaitée.

Acidité titrable ou acidité totale : par titrage à la soude avec la phénolsulfonephtaléine en indicateur interne (pH de virage = 7,0).

Acidité volatile : par la méthode DUCLAUX-GAYON.

pH : par mesure électrométrique avec le couple d'électrodes verre et calomel.

Sucres réducteurs totaux : par la méthode de Fehling ou de Bertrand, selon la précision désirée.

Glucose : par oxydation par l'iode en milieu alcalin. On dose en même temps les acides uroniques, mais cette méthode suffit pour l'établissement ultérieur d'un bilan de l'anhydride sulfureux.

Éthanal : par la méthode JAULMES-ESPEZEL modifiée.

Ann. Technol. agric., 1966, **15** (3), 289-294.

ÉTUDE GÉNÉTIQUE DE MUTANTS « COLONIE LISSE » SÉLECTIONNÉS PAR CULTURE SUR ACIDE ACÉTIQUE

P. GALZY et C. BIZEAU

avec la collaboration technique de Émilienne BIZEAU et C. PLAN

Laboratoire de Recherches de la Chaire de Génétique,
Centre de Recherches agronomiques du Midi,
École nationale supérieure agronomique, 34 - Montpellier

SOMMAIRE

Des mutants caractérisés par la morphologie coloniale « colonies lisses » ont été sélectionnés par culture sur acide acétique.

L'étude génétique de ces mutants est présentée.

I. — INTRODUCTION

La culture prolongée de la levure de boulangerie *Saccharomyces cerevisiae* dans des milieux où le substrat carboné est l'acide acétique, l'acide lactique ou l'éthanol s'accompagne d'une sélection de mutants (P. GALZY, 1964 *a* et *b*). Ces mutants sont caractérisés par leur morphologie coloniale. Ils donnent sur des milieux où le substrat carboné est l'acide lactique, l'acide acétique ou l'éthanol, des colonies lisses, alors que les souches sauvages donnent des colonies plissées.

L'étude des mutants sélectionnés sur acide lactique (P. GALZY, 1964 *a*) et sur éthanol (P. GALZY et C. BIZEAU, 1965 *a* et *b*) a montré que la mutation colonie lisse est stable en multiplication végétative. Ces premiers résultats ont permis la mise en évidence de 9 loci indépendants : PL_1, PL_2, PL_3, PL_4, PL_5, PL_7, PL_8, PL_{10}, PL_{11}. La présence dans une souche haploïde de l'un quelconque des gènes mutés lui assure le phénotype « colonie lisse ». Les gènes mutés sont récessifs. Les gènes pl_4, pl_{10} et pl_{11} ont été trouvés très fréquemment dans les cultures en présence d'éthanol et n'ont au contraire été rencontrés sur acide lactique que rarement (pl_4) ou même jamais (pl_{10}, pl_{11}). Par contre, les gènes pl_1, pl_3, pl_5 et pl_7 ont été rencontrés très fréquemment dans les cultures sur acide lactique et très rarement dans les cultures sur éthanol.

Il faut rappeler en outre que sur les 46 mutants isolés dans les cultures sur acide lactique (18) ou sur éthanol (28), 43 étaient stables en multiplication végétative et avaient muté pour l'un des 9 loci précédemment cités. L'un des mutants sélectionné sur acide lactique était stable en multiplication végétative mais il n'est pas certain que l'apparition du caractère colonie lisse ait été provoquée par la mutation d'un seul gène dans ce cas particulier. Enfin, l'un des mutants sélectionnés sur acide lactique et deux des mutants sélectionnés sur éthanol présentaient des mutations réverses fréquentes.

Dans l'exposé qui va suivre, nous discuterons les résultats obtenus au cours de l'étude de mutants sélectionnés par culture prolongée en présence d'acide acétique.

II. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

a) *Milieux de culture*

Un milieu synthétique liquide (milieu G) a été utilisé pour effectuer les sélections (GALZY et SLONIMSKI, 1957). La source carbonée est l'acide acétique 0,5 p. 100 ou le glucose 0,5 p. 100. Les souches sont stockées en tube de gélose inclinée contenant le milieu suivant : gélose 2 p. 100, glucose 0,5 p. 100, extrait de levure Difco 0,5 p. 100.

Le phénotype des diverses souches (colonie lisse ou colonie plissée) est testé sur un milieu gélosé 4 p. 100 à base d'extrait de levure Difco 0,5 p. 100 et d'acide lactique 0,5 p. 100 (Milieu C). Le pH est réglé entre 5 et 6 à l'aide de potasse.

b) *Matériel biologique*

Les deux souches utilisées présentent des besoins en facteurs de croissance complémentaires (L. CLAVILLIER, 1962). Elles proviennent du laboratoire du Pr ROMAN. Leur génotype est le suivant :

4 021 D_3 : *a* ad_{3-6} ad_2 hi_1 tr_1 me_1
6 153 C_9 : α ad_{3-3} ad_6 ur_1

Ces souches seront désignées dans la suite de l'exposé par les lettres D et C.

c) *Techniques génétiques*

Les techniques génétiques ont été précédemment décrites (P. GALZY, 1964 *a* ; P. GALZY et C. BIZEAU, 1965 *a*). Rappelons que les croisements sont effectués dans un tube à essais contenant un milieu de culture liquide (extrait de levure 0,5 p. 100 ; glucose 0,5 p. 100). Après 24 h, on observe de nombreuses figures de copulation. Les deux souches présentent des besoins en facteurs de croissance complémentaires. La culture est étalée sur un milieu synthétique ne contenant pas ces facteurs mais pouvant contenir éventuellement les facteurs dont les deux souches ont besoin (milieu minimum). Les cellules diploïdes issues du croisement donnent une colonie alors que les parents haploïdes ne poussent pas. Pour les tests d'allélisme, le croisement est effectué de la même manière entre la souche en expérience et une souche test de génotype connu. Les colonies diploïdes obtenues sont prélevées et leur phénotype est étudié. La dissection des asques est effectuée en chambre de HAWTHORNE suivant la technique de JOHNSON et MORTIMER. La ségrégation des marqueurs a été testée, ce qui a permis d'éliminer les contaminations.

III. — RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

1. *Isolement des mutants*

Des mutants colonies lisses ont été recherchés chez les souches C et D. Afin d'être assuré que chaque mutation correspond à un événement génétique indépendant, nous avons procédé comme suit : la souche sauvage est étalée sur milieu C ;

quelques clones « colonies plissées » d'origine monocellulaire sont isolés par prélèvement d'une colonie plissée. Ces clones sont cultivés indépendamment sur milieu liquide G à base d'acide acétique. Après plusieurs cultures successives, un étalement est effectué sur le milieu gélosé C. Un seul mutant, c'est-à-dire une seule colonie lisse, est prélevée dans chaque clone. Les mutants isolés sont désignés par l'indicatif (C ou D) de leur souche d'origine suivi de la lettre L et d'un numéro d'ordre. Rappelons que les colonies des souches sauvages étalées sur milieu C sont fortement plissées, de couleur blanc mat. Les mutants isolés après sélection sur acide lactique ou éthanol donnent dans les mêmes conditions des colonies lisses brillantes et de couleur crème. Parmi les mutants isolés ici quelques-uns présentent ce même aspect très typique, mais la plupart donnent des colonies ternes qui se boursouflent plus ou moins en vieillissant. Le tableau I indique pour tous les mutants le nombre de repiquages effectués sur le milieu à base d'acide acétique avant l'étalement, le pourcentage de mutants dénombrés et l'aspect des colonies lisses observées. Chaque repiquage effectué en présence d'acide acétique représente environ 4 générations cellulaires. Dans l'ensemble, les mutants sont apparus plus vite au cours des cultures successives sur acide acétique dans les clones de D que dans ceux de C.

TABLEAU I

Liste des mutants sélectionnés par culture sur acide acétique

Numéro d'ordre	Nombre de repiquages	Pourcentage de colonie lisses	Aspect des colonies	Stabilité
DL_{35}	6	1	ternes	—
DL_{36}	6	1	ternes	+
DL_{37}	4	1	brillantes	—
DL_{38}	6	5	ternes	—
DL_{39}	6	2	brillantes	—
DL_{40}	6	20	brillantes	+
DL_{41}	3	1	brillantes	—
DL_{42}	3	2	brillantes	—
CL_{13}	2	1	brillantes	+
CL_{14}	9	1	brillantes	—
CL_{15}	14	2	ternes	—
CL_{16}	14	1	ternes	—
CL_{17}	21	1	brillantes	+
CL_{18}	21	1	brillantes	—
CL_{19}	20	80	ternes	—
CL_{20}	9	1	ternes	—

Il est donc probable que la mutation colonie lisse présente un avantage sélectif plus grand par rapport au génotype sauvage dans le cas de la souche D que dans le cas de la souche C.

2. *Stabilité de la mutation au cours de la multiplication végétative*

Nous avons d'abord contrôlé la stabilité au cours de la multiplication végétative en présence et en absence d'acide acétique du caractère « colonies lisses » chez les

mutants sélectionnés par culture prolongée sur acide acétique. La mutation « colonie lisse » est stable chez plusieurs mutants : CL_{13}, CL_{17}, DL_{36} DL_{40}. Tous les autres ont présenté des mutations réverses fréquentes.

Pour ces derniers, une expérimentation a été réalisée selon le schéma suivant : la souche mutante est étalée à la surface d'un milieu C en boîte de Petri afin d'effectuer un clonage. Une colonie lisse est prélevée et sert à ensemencer un milieu glucosé et un milieu à base d'acide acétique. A intervalles réguliers, un prélèvement et un étalement sur milieu C sont effectués. Au départ toutes les cellules sont « colonies lisses ». Progressivement, des colonies plissées apparaissent aussi bien en présence d'acide acétique qu'en présence de glucose. Le pourcentage de colonies plissées augmente encore après la fin de la croissance.

La réversion « colonie lisse » vers « colonie plissée » dans le cas de ces souches instables peut donc se produire, aussi bien pendant la croissance active qu'en l'absence de toute multiplication, avec une fréquence très élevée. Le phénotype « colonie lisse » observé chez ces clones n'est donc probablement pas lié à une mutation génique simple comme c'était le cas pour les mutants « colonies lisses » isolés dans des cultures sur acide lactique ou éthanol.

3. *Tests fonctionnels d'allélisme*

Des tests fonctionnels d'allélisme ont été d'abord réalisés pour les mutants présentant une stabilité normale au cours de la multiplication végétative. Les souches DL_{36} et DL_{40} ont muté pour le locus PL_{10}. La souche CL_{13} a muté pour le locus PL_2. La souche CL_{17} a muté pour le locus PL_4.

Des tests d'allélisme ont été également effectués avec les « mutants » qui ne sont pas stables en multiplication végétative. Les diploïdes obtenus présentent un phénotype peu net. Quelquefois, les colonies sont typiquement plissées mais le plus souvent, elles présentent un aspect intermédiaire. Dans un grand nombre de cas, on trouve un mélange de colonies plissées, de colonies lisses et de colonies de types intermédiaires.

4. *Transmission à travers la reproduction sexuée*

Le mutant CL_{20} a été croisé avec un clone plissé de la souche 4 021 D_3. Le diploïde obtenu présentait des colonies plissées. L'analyse des tétrades a été effectuée par microdissection et 25 asques complets et normaux pour la ségrégation des marqueurs ont été obtenus. De nombreuses spores donnent une descendance « plissée » typique et homogène. D'autres donnent des colonies très faiblement plissées et une descendance hétérogène. Il apparaît à la fois des colonies plissées typiques, des colonies pratiquement lisses et des colonies d'aspect intermédiaire dans les étalements de ces clones instables. Certaines des tétrades étudiées donnent 2 clones « colonies plissées » typiques et 2 clones d'aspect atypique. Mais dans la plupart des cas, la ségrégation observée n'est pas régulière. Le caractère « colonie lisse » du mutant CL_{20} ne correspond donc pas à une mutation génique et n'obéit pas à un rythme mendélien simple. Le caractère « colonie lisse » n'est pas transmis sous cette forme à travers la reproduction sexuée. Cependant la mutation de CL_{20} a provoqué des anomalies dans la descendance du croisement.

DISCUSSION

Après culture prolongée en présence d'acide acétique comme seule source de carbone, il apparaît des « mutants » « colonies lisses » dans une souche de levure initialement « colonies plissées ». Sur les 16 mutants d'origine indépendante isolés, 4 ont présenté une mutation pour un locus précis. Tous les autres sont instables en multiplication végétative. Des réversions « colonies lisses » vers « colonies plissées » se produisent, même en l'absence de croissance, avec une très grande fréquence. Le caractère « colonies lisses » de ces « mutants » n'est pas transmis à travers la reproduction sexuée. Il paraît exclu que le phénotype « colonies lisses » de ces clones instables soit lié à la mutation d'un gène.

De même, il semble peu probable que l'apparition du phénotype lisse corresponde à une adaptation enzymatique. En effet, une faible fraction de la population initiale devient « colonies lisses ». Les réversions se produisent aussi bien en présence qu'en absence d'acide acétique. Enfin, la descendance d'un croisement d'un de ces mutants instables avec une souche « colonies plissées » présente des anomalies. Le mécanisme génétique responsable de l'apparition du phénotype « colonies lisses » est probablement complexe et il serait actuellement prématuré de vouloir le définir.

Les mutants « colonies lisses » que nous avons étudiés à ce jour peuvent se répartir en cinq catégories. Dans les mutants du premier groupe, l'apparition du caractère « colonies lisses » est liée à la mutation de l'un des loci suivants : PL_{10}, PL_{11} ou PL_4. Ces mutants sont sélectionnés par culture sur éthanol presque exclusivement. Les mutants du deuxième groupe présentent une mutation pour un des loci PL_1, PL_3, PL_5 ou PL_7 et sont sélectionnés préférentiellement par culture sur acide DL-lactique. La mutation de l'un de ces quatre loci modifie le métabolisme de l'acide L-lactique. Un troisième groupe correspond à la mutation du locus PL_2. Des mutants présentant une mutation pour ce locus ont été isolés dans les cultures sur éthanol, sur acide lactique et sur acide acétique mais toujours très rarement. La mutation de PL_2 vers pl_2 présente donc un avantage sélectif sur tous les substrats non fermentescibles que nous avons utilisés. Les mutants du quatrième groupe ont été sélectionnés sur acide acétique. Ils sont instables en multiplication végétative et le mécanisme génétique responsable chez eux de l'apparition du phénotype « colonies lisses » n'est pas encore connu. Sur 16 mutants isolés à partir de cultures sur acide acétique, 12 appartiennent à ce groupe. Enfin, il convient de mettre à part le gène pl_8 qui n'a été trouvé qu'une seule fois. Il est probable qu'il ne donne qu'un faible avantage sélectif. Il est difficile de le situer dans la tentative de classification que nous venons de présenter.

De toute façon, il apparaît nettement que plusieurs types physiologiques de mutants « colonies lisses » sont maintenant connus. Les mutations considérées modifient probablement le fonctionnement de la chaîne des oxydations cellulaires en intervenant à des niveaux différents selon le locus considéré. Leur étude au niveau physiologique et enzymatique peut donc présenter un intérêt considérable.

Reçu pour publication en juin 1966.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CLAVILLIER L., 1962. *Recherches sur la spécificité génétique de l'inhibition par l'histidine des réversions chez la levure* Saccharomyces cerevisiae, Thèse, Paris.

GALZY P., 1964 *a*. Étude génétique et physiologique du métabolisme de l'acide lactique chez *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN. *Ann. Technol. agric*, **2**, 109-259.

GALZY P., 1964 *b*. Variations génétiques de la levure au cours de la croissance sur des substrats non glucidiques. *Heredity*, **19**, 731-733.

GALZY P. BIZEAU Cl., 1965 *a*. Étude du contrôle génétique du caractère « Colonie lisse » chez *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN. *Heredity*, **20**, 31-36.

GALZY P., BIZEAU Cl., 1965 *b*. Sur le contrôle génétique de la mutation « Colonie lisse » chez *Saccharomyces cerevisiae*. Étude de mutants sélectionnés par culture sur éthanol. *C. R. Acad. Sci.*, **231**, 3490-3493.

GALZY P., SLONIMSKI P. P., 1957. Variations physiologiques de la levure au cours de la croissance sur l'acide lactique comme seule source de carbone. *C. R. Acad. Sci.*, **245**, 2423.

Ann. Technol. agric., 1966, **15** (3), 295-302.

ACCROISSEMENT DE LA TENEUR EN STÉROLS DANS LES LEVURES IRRADIÉES AU COURS DE LEUR CULTURE

P. DUPUY, J. MAUGENET et J.-N. MORFAUX

Station de Technologie végétale, Route de Saint-Cyr, 78 - Versailles

SOMMAIRE

L'irradiation gamma (100 krad) répartie au cours du développement d'une culture de levure permet une accumulation plus précoce de l'ergostérol, ralentit la multiplication sans empêcher la croissance des cellules qui atteignent une taille supérieure à la normale.

INTRODUCTION

Les radiations ionisantes favorisent la synthèse des composés stéroïdes, aussi bien dans les tissus d'animaux supérieurs (Bucher, 1958) que chez les microorganismes (Meissel, 1955). Dans le cas des levures, l'irradiation produit en même temps une inhibition de la multiplication cellulaire et s'accompagne de changements dans le métabolisme du phosphore et des hydrates de carbone qui ont été décrits par Spoerl et Looney (1958).

L'étude que nous avons entreprise a pour but de préciser dans quelles conditions des cultures de levures, ayant subi des irradiations gamma au cours de leur développement, peuvent accumuler des quantités importantes d'ergostérol. La production des levures riches en stérols peut en effet avoir un intérêt en tant que source industrielle d'ergostérol, et comme apport alimentaire de provitamine D dans certaines rations animales.

I. — TECHNIQUES ET MÉTHODES

1. *Conditions de culture*

Diverses souches de levures ont été utilisées au cours de ce travail. Elles appartiennent aux deux espèces : *Saccharomyces cerevisiae* et *Saccharomyces carlsbergensis*, et sont conservées dans la collection de notre laboratoire. La désignation de ces souches correspond à des isolements pratiqués sur divers produits ayant des origines géographiquement différentes. *S. carlsbergensis ATCC 23 45* provient de l'*American Type Culture Collection*, cette souche est recommandée par cet organisme pour la production d'ergostérol.

Les milieux suivants ont été employés pour comparer la production d'ergostérol par ces souches de levures.

. *Milieu « Malt WICKERHAM »* :

Extrait de levure Difco	3 g
Extrait de malt Difco	3 g
Peptone pancréatique	5 g
Glucose	10 g
Eau désionisée.....	1 000 ml

Le milieu est ajusté si nécessaire à pH = 5,8 et stérilisé 20 mn à 120°C. Dans certaines expériences, la concentration en glucose de ce milieu a été augmentée.

. *Milieu mélasse* :

Mélasse de betterave	110 g
Peptone pancréatique	10 g
Phosphate monopotassique.....	1 g
Eau désionisée.....	1 000 ml

Le pH est ajusté à 6,6 et le milieu est centrifugé 1 heure à 10 000 *g* pour éliminer les matières insolubles apportées par la mélasse. Ce milieu est stérilisé 20 mn à 120°C ; il contient 50 g/l de sucres.

Les cultures sont réalisées dans des fioles à plasma de 500 ml contenant 70 ml de milieu liquide. On ensemence avec 1 ml d'une culture de 24 heures sur le même milieu. Les fioles sont incubées à 28°C sur un agitateur. Le bouchage des fioles est lâche pour ne pas s'opposer au transfert d'oxygène qui, dans ces conditions, est égal à 0,5 millimole d'O_2 par litre et par minute.

Les cellules de levures sont récoltées par centrifugation à 0°C, lavées deux fois à l'eau distillée. Elles sont conservées lyophilisées ou congelées à — 20°C.

2. *Détermination des stérols*

Les lipides de 20 à 25 mg de levures, mises en suspension dans 5 ml de NaOH à 5 p. 100, sont saponifiés en les traitant à l'autoclave pendant 1 heure à 120°C. La partie insaponifiable est reprise au cours de deux extractions successives avec 4 ml d'éther éthylique, en agitant pendant 1 heure. L'extrait dans l'éther est évaporé sous azote et repris dans 10 ml de chloroforme.

Les stérols sont déterminés dans cet extrait par le réactif de Liebermann-Burchard :

7,5 ml d'anhydride acétique
0,5 ml d'acide sulfurique concentré
12 ml de chloroforme

On mélange, volume à volume, l'échantillon et le réactif. La coloration se développe pendant 25 minutes à 25°C et la densité optique est mesurée à 420 mμ. La teneur en stérols est rapportée à une courbe standard d'ergostérol.

On a aussi utilisé la méthode de dosage après séparation par chromatographie en couche mince qui a déjà été décrite dans une publication antérieure (MAUGENET, MORFAUX, 1965).

3. *Irradiation.*

Les irradiations sont obtenues en plaçant les fioles de culture dans une source chargée de ^{60}Co. Les diverses doses sont données en faisant varier le temps de séjour dans l'appareil. Comme l'irradiateur est à température ambiante, la température de la culture diminue pendant l'irradiation mais sans descendre au-dessous de 20°C.

II. — RÉSULTATS.

1. *Production comparée de diverses couches*

La production de stérols par diverses souches a été comparée, dans le milieu Malt Wickerham, en vue de sélectionner celles dont les aptitudes paraissent les plus intéressantes. Les dosages ont été faits après 4 ou 5 jours de culture, alors que la multiplication des cellules était terminée depuis longtemps.

Les résultats du tableau 1 montrent que, dans un milieu où la teneur en glucose est le facteur limitant l'accumulation des stérols, il existe de grandes différences dans l'aptitude des diverses souches. Par contre, la comparaison des moyennes n'indique pas de différence entre les espèces *S. cerevisiae* et *S. carlsbergensis*.

TABLEAU I

Production d'ergostérol par deux espèces de levures

Souche	*S. cerevisiae*			Souche	*S. carlsbergensis*		
	Poids sec des levures (g/l)	Rendement en stérols			Poids sec des levures (g/l)	Rendement en stérols	
		en % du poids sec	en mg/l de milieu			en % du poids sec	en mg/l de milieu
59 R	4,5	1,03	46	*L d 7*	4,75	1,55	74
59 R	5,4	1,15	62	*X O 8*	4,4	0,98	43
CC 53-1	3,7	1,80	67	*G g 2*	3,4	1,20	41
12 Beaune	3,5	1,08	38	*U f 12*	2,3	0,87	20
Delft	3,6	0,95	34	*Y b 1*	4,3	0,69	30
CC 53-F 4	4,2	0,71	30	*Y b 5*	2,7	0,82	22
S 131	2,6	0,66	17	*Y c 2*	5,0	1,03	52
Faivre	3,3	1,22	40	*W b 1*	0,7	0,88	6
Yougoslavie	4,0	1,20	48	*W h 1*	4,4	1,39	61
				W k 1	5,45	0,98	53
Moyenne		1,09		*Moyenne*		1,04	

Cultures pendant 4 et 5 jours dans Malt Wickerham.

Les souches qui paraissent les plus productives ont été comparées sur divers milieux. Le rendement global en stérols de la culture dépend à la fois de la quantité de levures produite et de la teneur en stérols des cellules. Les résultats de ces expériences sont rassemblés dans le tableau 2. La souche de *S. carlsbergensis ATCC 2345* accumule bien des quantités de stérols nettement supérieures à la moyenne, mais elle le fait aux dépens d'un rendement de croissance plus faible. C'est ainsi que cette souche accumule après 2 jours, dans le milieu le plus favorable, 185 mg de stérols par litre de culture, alors que la souche *CC 53-1* en accumule dans les mêmes conditions 427 mg.

TABLEAU 2

Comparaison de la production de stérols sur divers milieux

	Malt Wickerham 1 % glucose			Malt Wickerham 5 % glucose			Mélasse 10 %, peptone 1 %, phosphate 0,1 %		
	Récolte poids sec des levures en g/l	Rendement en stérols		Récolte poids sec des levures en g/l	Rendement en stérols		Récolte poids sec des levures en g/l	Rendement en stérols	
		en % du poids sec	en mg/l de milieu		en % du poids sec	en mg/l de milieu		en % du poids sec	en mg/l de milieu
	Après 4 jours			Après 4 jours			Après 2 jours		
S. cerevisiae 59 R	4,50	1,03	46	9,6	1,28	123	12,3	2,89	355
	Après 4 jours			Après 4 jours			Après 2 jours		
S. cerevisiae CC 53-1	3,7	1,80	67	9,0	1,94	175	17,05	2,51	428
	Après 5 jours			Après 4 jours			Après 2 jours		
S. carlsbergensis Ld 7	4,75	1,55	74	6,5	1,92	125	14,55	2,45	357
							Après 2 jours		
S. carlsbergensis ATCC 2345							6,8	3,68	251
							Après 3 jours		
							9,0	4,35	392

Pour cette raison, les essais qui ont suivi ont été réalisés avec la souche de *S. cerevisiae CC 53-1*. La souche de *S. carlsbergensis* présente, en outre, l'inconvénient d'avoir une croissance plus lente et de floculer facilement, ce qui rend incertaines les numérations au compte-globule.

2. *Accumulation des stérols au cours de la culture*

Le tableau 3 donne les résultats d'une culture qui a été poursuivie pendant six jours. Dans le milieu à base de mélasse utilisé, les stérols sont en grande partie accumulés dès la fin du premier jour de la culture. Bien qu'à ce moment-là le glucose soit déjà épuisé, les cellules continuent à croître vraisemblablement aux dépens de l'alcool. La teneur en stérols augmente encore dans la culture alors que la richesse en stérols des cellules diminue légèrement.

TABLEAU 3

Accumulation des stérols au cours de la culture
S. cerevisiae CC 53-1 cultivée dans mélasse 10 p. 100, peptone 1 p. 100

	Poids sec (g/l)	Azote (N %)	Stérols (%)	Rendement en stérols (mg/l de milieu)
9 heures	4,7	9,75	1,3	61
1 jour	10,1	6,7	2,2	222
2 jours	16,2	4,3	1,8	292
3 jours	15,7	4,6	1,8	283
4 jours	16,0	4,4	1,9	304
5 jours	16,2	—	1,9	308
6 jours	15,8	4,8	1,9	302

Dans le milieu que nous avons utilisé, la synthèse des stérols paraît être limitée par la disparition précoce du glucose. Lorsque le milieu ne contient plus de glucose, la teneur en azote et en stérols des cellules diminue bien que l'on observe encore une certaine croissance de la culture. Pour obtenir des cellules ayant une teneur maximale en stérols, il n'est donc pas nécessaire de poursuivre la culture au-delà de deux jours.

3. *Effets de l'irradiation*

Des expériences préliminaires ont montré que l'irradiation de levures en fin de culture, avec des doses de 20 à 200 krad, ne modifie pas leur teneur en stérols, même si elles sont aérées dans un milieu auquel a été ajouté du glucose. Dans ces conditions, les levures ne se multiplient plus et elles ne réalisent aucune synthèse de stérols.

Il en est autrement lorsque l'irradiation est donnée au début du développement de la culture. C'est ainsi qu'on a comparé simultanément le développement de trois cultures sur Malt Wickerham. La culture A n'a pas reçu d'irradiation et son agitation a été interrompue lorsque les autres cultures étaient placées dans l'irradiateur. La culture B a reçu 100 krad (45 minutes d'irradiation) six heures après son ensemencement. La culture C a reçu la même dose d'une manière fractionnée : 40 krad au

moment de l'ensemencement et ensuite 20 krad toutes les deux heures jusqu'à atteindre la dose de 100 krad. Sept heures après le début de la culture, on ajoute une solution concentrée de glucose introduisant 4 p. 100 de glucose dans le milieu. Par la suite, des prélèvements aux fins d'analyses ont été faits après 9, 24 et 48 heures. Les résultats de ces analyses font l'objet du tableau 4.

TABLEAU 4

Comparaison de cultures irradiées et non irradiées
S. cerevisiae CC 53-1. Voir le texte pour les conditions de culture

Durée de culture		Culture A non irradiée	Culture B irradiée (100 krad 1 fois)	Culture C irradiée (100 krad fract.)
9 h	Poids sec en g/l	4,7	4,6	3,3
	Azote (N %)	9,7	8,8	9,7
	Stérols (%)	0,9	0,9	1,4
	Poids moy. d'une cellule $\times 10^{-12}$ g	17	19	53
24 h	Poids sec en g/l	10,9	10,0	8,4
	Azote (N %)	4,6	4,9	5,6
	Stérols (%)	1,9	2,1	2,8
	Poids moy. d'une cellule $\times 10^{-12}$ g	19	35	52
48 h	Poids sec en g/l	12,5	11,4	10,0
	Azote (N %)	4,7	4,9	6,1
	Stérols (%)	1,9	2,0	3,1
	Poids moy. d'une cellule $\times 10^{-12}$ g	18	31	47

On constate que l'irradiation fractionnée augmente la teneur en stérols des levures qui se sont développées après le traitement. Les cellules, qui se sont multipliées après irradiation, sont aussi légèrement plus riches en azote. Comme on le verra plus en détail, par la suite, l'irradiation diminue le nombre de cellules présent en fin de culture et produit des cellules plus grosses.

Lorsque la dose est donnée en fractions de 10 krad, les modifications que nous venons de décrire ne sont pas accentuées. A la suite de ces observations, on a décidé de donner la dose d'irradiation par fractions successives de 20 krad toutes les deux heures, ce qui permet de l'étaler sur toute la phase de croissance et de se rapprocher ainsi de ce que pourrait donner une irradiation de la culture en continu.

Un simple examen microscopique permet de remarquer que les cultures de levures ainsi irradiées contiennent des cellules ayant des tailles très différentes. On sait, en effet, que l'irradiation agit surtout sur les processus de division et moins sur la croissance. Comme la population de la culture irradiée est plus hétérogène que celle de la culture normale, le poids moyen des cellules donne une idée imparfaite de l'importance du phénomène. Malgré cela, les résultats du tableau 4 font ressortir des poids moyens, nettement supérieurs pour les cellules provenant de la culture irradiée.

D'autres cultures ont été faites sur milieu à base de mélasse dans lequel la croissance est plus abondante. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 5. On constate

que le rendement en poids de la culture n'a pas été diminué par l'irradiation et que les stérols s'accumulent d'une façon plus précoce dans la culture irradiée.

Les préparations des stérols extraites de levures irradiées et non irradiées ont été analysées par chromatographie en couche mince. La nature des stérols formés est identique dans les deux cas. On identifie facilement l'ergostérol et ses esters par leur

TABLEAU 5

Comparaison de cultures irradiées et non irradiées

S. cerevisiae CC 53-1- cultivée dans : mélasse 10 p. 100, peptone 1 p. 100, phosphate 0,1 p. 100.

Durée de culture		Culture A' non irradiée	Culture C' irradiation fractionnée (5 fois 20 krad)
24 h	Poids sec en g/l	10,8	10,0
	Poids moyen d'une cellule $\times 10^{-12}$ g	27	35
	Azote (N %)	6,9	7,3
	Lipides totaux (%)	5,1	4,3
	Stérols (%)	1,8	2,5
	dont estérifiés (%)	21	46
48 h	Poids sec en g/l	15,1	16,9
	Poids moyen d'une cellule $\times 10^{-12}$ g	30	62
	Azote (N %)	5,3	5,0
	Lipides totaux (%)	3,7	4,6
	Stérols (%)	2,6	2,6
	dont estérifiés (%)	38	43

Rf et leur spectre ultraviolet. Le lanostrérol et le squalène, intermédiaires de la biosynthèse de l'ergostérol, qui sont nettement identifiés dans les levures en voie de multiplication, disparaissent lorsque la croissance de la culture est terminée. On constate que l'ergostérol s'estérifie d'une façon plus précoce dans la culture irradiée.

III. — DISCUSSION.

Des moyens très différents ont été proposés pour modifier la teneur des levures en stérols. GAL'TSOVA et VAKINA (1963) ont suggéré que l'irradiation et les substances favorisant l'accumulation des stérols avaient en commun une action sur la glycolyse. Plusieurs de ces substances, 2-4-dinitrophénol, acide monoiodoacétique, fluorure, sont aussi des inhibiteurs du métabolisme et doivent provoquer une diminution du rendement en cellules lorsqu'elles sont ajoutées à un milieu de culture.

L'irradiation gamma, lorsqu'elle est fractionnée au cours du développement des levures, n'a pas cet inconvénient. Nous avons montré que le rendement en poids sec de la culture n'est pratiquement pas modifié, car les cellules qui n'ont pu se multiplier n'en ont pas moins continué à augmenter de poids. La teneur en stérols est habituellement augmentée par l'irradiation. Dans tous les cas, les stérols s'accumulent en quan-

tité importante dans les levures dès que les cellules ne peuvent plus se multiplier.

Il semble bien que la synthèse accrue des stérols à la suite de l'irradiation n'entraîne pas une synthèse générale des lipides. En outre, l'irradiation ne provoque pas une diminution de la teneur en azote des cellules, ce qui indique qu'il n'y a pas de concurrence entre la synthèse protéique et celle des stérols. La présence de levures ayant des tailles différentes permet de se demander si toutes les cellules ont bien la même composition moyenne. On peut supposer par exemple que les cellules géantes ne contiennent pas une proportion de stérols plus importante que celle des levures de taille normale. Des expériences sont actuellement en cours pour répondre à cette question.

Reçu pour publication en juin 1966.

SUMMARY

INCREASING THE STEROL CONTENT OF YEASTS IRRADIATED DURING THEIR DEVELOPMENT

Several strains of yeasts are compared according to their sterol content. There is no difference in sterol content between *S. cerevisiae* and *S. carlbergensis*. Gamma irradiation increases ergosterol synthesis in yeasts when a dose of 100 krad is fractionated during the culture development. Irradiation does not modify the chemical nature of synthetized sterols but produces a early accumulation of ergosterol and particularly of the esterified part. The weight of yeast harvested after 48 hours of culture is the same in irradiated and unirradiated culture. Irradiation prevents multiplication but not growth and this produces the formation of giant cells.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BUCHER N. L. R., 1958. Alterations of cholesterol biosynthesis in liver cell fractions from rats in various experimental conditions. *Ciba Foundation Symposium Biosynthesis of Terpens and Sterols*, 46-60.

GAL'TSOVA R. D., VAKINA I. P., 1963. Factors affecting the biosynthesis of sterols in yeasts. *Mikrobiologiya* (English translation 1964), **33**, (3), 390-396.

MAUGENET J., MORFAUX J. N., 1965. Séparation, identification, évaluation quantitative de l'ergostérol et de ses précurseurs dans la levure. *Ann. Technol. of agric.*, **1**, 23-33.

MEISSEL M. N., 1955. L'action biologique des rayonnements ionisants sur les microorganismes. *Actes Conf. Int. Genève*, **11**, 264-282.

SPOERL E., LOONEY D., 1958. Carbohydrate metabolism in yeast accompanying an inhibition of cell division by X-rays. *J. Bacteriol.*, **76**, 70-74.

Ann. Technol. agric., **15** (3), 303-309.

COMPARAISON DE QUELQUES MÉTHODES DE DOSAGE DE L'ACIDE LACTIQUE DANS LES VINS

G. GUIMBERTEAU et E. PEYNAUD

Station agronomique et œnologique, 33 - Bordeaux

SOMMAIRE

Nous avons comparé cinq méthodes chimiques de dosage de l'acide lactique en les appliquant à douze vins rouges et à douze vins blancs secs et doux. La comparaison porte sur la commodité d'exécution du dosage et sur la valeur des résultats obtenus. D'autre part, la fidélité et la précision de chacune de ces méthodes ont été déterminées par l'analyse statistique de huit résultats successifs obtenus pour un même vin. La méthode qui s'est révélée la plus sûre, et que nous avons adoptée pour nos travaux de recherches, opère la fixation de l'acide lactique sur colonne d'échangeur d'anions et utilise l'oxydation cérique en acétaldéhyde (méthode de DIMOTAKI-KOURAKOU). La méthode de PEYNAUD et CHARPENTIÉ (oxydation permanganique après défécations plombique et barytique) convient bien à la grande série ; elle donne dans de rares cas des résultats un peu trop faibles, mais nous jugeons que sa précision est suffisante pour les dosages courants. Les méthodes colorimétriques proposées ont été écartées, car elles comportent des techniques de défécation insuffisantes.

MÉTHODES DE DOSAGE UTILISÉES

A la recherche de la meilleure méthode applicable aux vins et à divers milieux fermentés par les levures ou les bactéries lactiques, nous avons limité intentionnellement notre étude à cinq méthodes chimiques. L'objectif initial était de comparer les méthodes déjà un peu anciennes utilisées dans nos laboratoires, basées sur l'oxydation au permanganate, avec des méthodes plus récentes et en particulier avec les méthodes colorimétriques.

Notre but n'était pas d'appliquer à chacune de ces méthodes les tests permettant de reconnaître leur validité. Ainsi nous n'avons pas cherché dans quelle mesure une addition connue d'acide lactique pouvait se retrouver ; c'est d'ailleurs la condition la plus facile à satisfaire par une méthode de dosage. Nous ne les avons pas non plus appliquées à des vins synthétiques. Des essais de ce genre ont été déjà pratiqués par les auteurs des méthodes. Ici la justification d'une méthode repose sur sa spécificité et sur une bonne reproductibilité des résultats.

Il a été indiqué d'autres méthodes de dosage de l'acide lactique que celles étudiées dans ce travail, notamment celles basées sur la solubilité du lactate de baryum en milieu alcoolique et détermination de l'alcalinité des cendres — méthode MOSLINGER avec les modifications apportées par de nombreux auteurs notamment par MICHEL (1931) et en dernier lieu par KAIN et SCHNEYDER (1964) —,

celles utilisant la séparation de l'acide lactique et des autres acides organiques par la chromatographie de partage sur colonne d'échangeur d'anions et réception sur collecteur de fractions et se terminant par un titrage volumétrique, acidimétrique ou autre (CORDONNIER et BIZEAU, 1960 ; COURTOISER et RIBÉREAU-GAYON, 1963). Ces méthodes nous sont familières, mais nous pensons que les premières manquent de spécificité et nous réservons les secondes à des cas particuliers de séparation des acides organiques dans des milieux de composition peu connue.

HENNIG et LAY (1964) ont de la même façon comparé récemment pour les besoins de leur laboratoire quatre méthodes chimiques de dosage de l'acide lactique.

Nous étudierons ailleurs avec Mme LAFON-LAFOURCADE la méthode enzymatique basée sur l'oxydation de l'acide *l* (+) lactique par la lacticodéshydrogénase en présence de nicotamide adénine dinucléotide oxydé (NAD). Nous avons appliqué cette méthode à l'étude des formes isomères de l'acide lactique dans les vins, selon une idée que nous devons à P. BRÉCHOT de l'Institut Pasteur.

Méthode de ESPIL *et* PEYNAUD

Décrite par RIBÉREAU-GAYON et PEYNAUD (1937), elle est basée sur la production par oxydation au permanganate effectuée goutte à goutte à l'ébullition, d'une molécule d'acétaldéhyde à partir d'une molécule d'acide lactique. Cette réaction a donné lieu à de nombreux modes opératoires comportant divers procédés de défécation. On les connaît en Allemagne sous les noms de méthode de KOCH et BRETTHAUER (1951), aux États-Unis sous le nom de méthode de FRIEDEMANN (1933).

Dans la méthode de ESPIL et PEYNAUD les substances autres que l'acide lactique pouvant donner de l'acétaldéhyde sont éliminées par une double défécation : les acides organiques et les polyphénols sont précipités par l'acétate basique de plomb ; les glucides sont ensuite fixés par un mélange chaux-sulfate de cuivre. Nous renvoyons pour les détails opératoires à *Analyse et Contrôle des vins*, page 135 (RIBÉREAU-GAYON et PEYNAUD, 1958).

Comme les méthodes utilisées à cette époque, elle donne des résultats entachés d'une erreur par excès à cause de la présence de butanediol-2,3. De plus la défécation est insuffisante dans les vins très sucrés et dans ce cas il convient de séparer l'acide lactique par extraction à l'éther. Malgré ses imperfections, cette méthode est à la base de nos connaissances sur les teneurs en acide lactique des vins. Elle a permis à PEYNAUD (1947) de confirmer que dans toute fermentation alcoolique pure d'un moût il y a formation de quelques méq d'acide lactique par litre.

Méthode de PEYNAUD *et* CHARPENTIÉ (1950)

C'est une amélioration de la méthode précédente. Elle évite l'erreur due au butanediol-2,3, erreur qui peut atteindre 1 à 5 méq par l. Les acides organiques sont éliminés par défécation plombique et les glucides par précipitation barytique dans l'alcool. Le butanediol-2,3 est chassé ensuite par évaporation à sec en milieu neutre, dans des conditions où il n'y a pas de perte d'acide lactique.

Méthode de DIMOTAKI-KOURAKOU (1960)

Cette méthode utilise l'oxydation de l'acide lactique en acétaldéhyde, à l'aide de sulfate de cérium. Cet oxydant proposé par CASAS (1954) présente des avantages de commodité et de régularité sur le permanganate. La défécation habituelle est complétée par passage sur colonnes d'échangeurs de cations et d'anions.

Dans un premier temps, l'acétate basique de plomb écarte les polyphénols et les acides organiques autres que l'acide lactique. Le plomb est éliminé sur un échangeur de cations sous forme K^+. Puis l'acide lactique est fixé sur un échangeur d'anions sous forme CO_3^{--} ; la colonne est lavée à l'eau distillée pour éliminer complètement les substances neutres, en particulier les glucides ; on élue ensuite l'acide lactique par une solution de carbonate d'ammonium. L'éluat, qui ne contient que l'acide acétique et l'acide lactique du vin, est soumis à l'oxydation cérique.

Depuis 1960, Mme DIMOTAKI-KOURAKOU a reconnu que dans certains cas la méthode qu'elle avait proposée « présente une incertitude, parce que la précipitation du malate de plomb est incomplète et que le précipité entraîne une petite quantité de lactate de plomb » (Compte rendu de la 6e réunion de la Sous-Commission des méthodes d'analyses et éléments constitutifs des vins, O. I. V., Paris, 27-29 avril 1964). La séparation complète de l'acide lactique d'avec les autres oxyacides est satisfaisante dans le cas des vins pauvres en acides organiques, tels les vins des pays méridionaux ; par contre, pour les vins riches en acide malique, les courbes d'élution des deux acides chevauchent plus ou moins, ce qui a amené Mme DIMOTAKI-KOURAKOU (1966) à modifier légèrement sa méthode, en particulier en terminant par un titrage acidimétrique de l'acide acétique formé par oxydation chromique de l'acide lactique.

Pour les vins et les milieux qui nous intéressent, nous conservons le premier mode opératoire de la méthode dont nous préférons la spécificité de la réaction finale.

Méthode de REBELEIN (1961-1964)

Cette méthode nous est surtout connue par les traductions des travaux de REBELEIN effectuées par NEY pour le Service de la Répression des Fraudes et par le texte remis aux experts de la Sous-Commission des méthodes d'analyses de l'Office international du Vin (nº 167, 31 mars 1965).

Elle repose sur la séparation globale des anions par échange d'ions, puis oxydation cérique en acétaldéhyde à 65ºC, dans des conditions où les autres anions ne doivent pas interférer. L'acétaldéhyde est déterminé colorimétriquement par réaction avec le nitroprussiate et la pipéridine. GAROGLIO et GIANNARDI (1965) ont fait une critique favorable à cette méthode.

Méthode de SCHAELDERLE *et* HASSELMANN (1961)

Elle est basée sur la réaction d'EEGRIVE : par chauffage d'une solution d'acide lactique en présence d'acide sulfurique assez concentré et de sulfate de cuivre, il y a formation d'acétaldéhyde qui est caractérisé par la couleur violette de son produit de condensation avec le *p.* hydroxydiphényle. La réaction est très sensible et bien que la structure du composé soit inconnue, il est possible d'effectuer des dosages quantitatifs. La réaction d'EEGRIVE a été souvent appliquée au dosage de l'acide lactique dans les milieux les plus divers.

Bien entendu on doit éliminer les substances autres que l'acide lactique pouvant donner une réaction positive. Les auteurs précipitent les oxyacides et les polyphénols par l'acétate basique de plomb. Les colorations parasites provenant de l'action de l'acide sulfurique sur les glucides, les alcools supérieurs, etc. sont compensées en effectuant une mesure colorimétrique sans *p.* hydroxydiphényle.

RÉSULTATS ANALYTIQUES

Chaque méthode a fait l'objet de deux déterminations à quelques jours d'intervalle pour une série de vins ayant des compositions variées et des teneurs différentes en acide lactique. Sept des vins blancs utilisés présentaient une teneur en sucres réducteurs supérieure à 50 g par litre. Les tableaux 1 et 2 permettent de comparer les résultats des différentes méthodes pour ces séries de vins.

TABLEAU I

Comparaison des résultats obtenus pour des vins rouges

Les teneurs en acide lactique sont exprimées en g par litre.
Elles sont la moyenne de deux déterminations.
Ces vins avaient subi une fermentation malolactique.

Numéro des vins rouges	ESPIL et PEYNAUD	PEYNAUD et CHARPENTIÉ	DIMOTAKI-KOURAKOU	REBELEIN	SCHAELDERLE et HASSELMANN
1	1,67	1,22	1,18	1,66	1,55
2	1,76	1,26	1,07	1,65	1,22
3	1,11	0,76	0,76	1,18	1,27
4	2,30	1,82	1,81	1,91	2,27
5	1,41	0,90	0,91	1,08	1,29
6	2,70	1,96	2,64	3,58	3,07
7	1,25	1,01	1,09	1,19	1,30
8	1,84	1,30	1,30	1,60	1,30
9	1,62	1,25	1,32	1,65	1,90
10	1,34	1,01	1,15	1,42	1,37
11	1,98	1,60	1,58	1,88	1,65
12	1,48	1,09	0,96	1,42	1,27
Valeurs moy.	1,70	1,26	1,31	1,68	1,62

Nous avons noté également pour chaque méthode le temps nécessaire à un opérateur exercé pour obtenir dix résultats. Le délai indiqué ne correspond pas toujours au temps de travail effectif qui peut être plus long, en particulier lorsqu'on utilise les colonnes d'échangeurs d'ions qu'il faut régénérer, ou au contraire qui peut être plus court pour les méthodes comportant une attente lors de la défécation.

TABLEAU 2

Comparaison des résultats obtenus pour des vins blancs

Les teneurs en acide lactique sont exprimées en g par litre.
Elles sont la moyenne de deux déterminations.

Numéro des vins blancs	Espil et Peynaud	Peynaud et Charpentié	Dimotaki-Kourakou	Rebelein	Schaelderle et Hasselmann
13	0,65	0,45	0,41	0,52	0,62
14	2,01	1,61	1,49	1,77	1,85
15	1,42	0,45	0,88	1,06	1,17
16	1,44	0,98	0,92	1,32	1,35
17	0,75	0,45	0,39	0,67	0,90
18	0,96	0,44	0,76	0,92	1,35
19	1,70	0,59	1,33	1,50	1,70
20	1,40	0,63	0,77	1,03	0,95
21	1,27	0,52	0,69	0,79	1,15
22	1,00	0,35	0,42	0,28	0,70
23	0,58	0,29	0,29	0,22	0,45
24	1,44	0,99	0,92	1,20	1,10
Valeurs moy.	1,19	0,64	0,78	0,95	1,10

TABLEAU 3

Étude statistique de la reproductibilité des résultats pour les cinq méthodes de dosage de l'acide lactique essayées

Les teneurs en acide lactique sont exprimées en mg par litre.
L'étude porte sur huit dosages. L'intervalle de reproductibilité est calculé pour un degré de confiance de 95 % à partir du coefficient t de la table de Fischer égal à 2,36.

Méthodes analytiques	Vin rouge			Vin blanc liquoreux		
	Moyenne	Écart type	Intervalle de reproduct.	Moyenne	Écart type	Intervalle de reproduct.
Espil et Peynaud	2467	140	330	1798	81	191
Peynaud et Charpentié	1841	89	210	553	61	144
Dimotaki-Kourakou	1971	116	274	1330	56	132
Rebelein	1910	53	125	1503	31	73
Schaelderle et Hasselmann.	2274	89	210	1747	104	245

Le tableau 3 reproduit pour chacune des méthodes les résultats de l'étude statistique basée sur 8 dosages consécutifs appliqués à un même vin rouge et à un même vin blanc liquoreux.

Méthode	Temps nécessaire pour obtenir dix résultats	Observations
ESPIL et PEYNAUD	un jour	Pour les vins sucrés le précipité de la défécation est très volumineux et il est difficile de séparer par filtration un volume de liquide suffisant pour l'oxydation finale.
PEYNAUD et CHARPENTIÉ	un jour	Y compris le temps nécessaire à l'évaporation à sec.
DIMOTAKI-KOURAKOU	une demi-journée	A la condition de disposer d'une batterie double de dix colonnes d'échangeurs de cations et de dix colonnes d'échangeurs d'anions, et sans compter le temps nécessaire à la régénération.
REBELEIN	5 heures	A la condition de disposer d'une batterie simple de dix colonnes d'échangeurs d'anions ; l'échangeur ne peut servir qu'une seule fois. La réaction colorée au nitroprussiate et à la pipéridine est très fugace ; le maximum d'intensité est atteint en 90 à 120 secondes, puis la coloration diminue rapidement ; en 5 mn la densité optique chute de 0,500 à 0,050.
SCHAELDERLE et HASSELMANN	3 heures	La méthode comporte des dilutions très importantes et des volumes de prise d'essai très faibles. Elle a les inconvénients de la colorimétrie dans l'acide sulfurique concentré.

CONCLUSIONS

Deux méthodes donnent des résultats voisins. Les trois autres conduisent à des valeurs plus élevées ; ce sont les méthodes colorimétriques et la méthode de ESPIL et PEYNAUD.

Nous savons déjà que cette dernière conduit à des résultats erronés par excès à cause de la présence de butanediol-2,3 qui échappe à la défécation et, dans les vins très sucrés, d'une fixation insuffisante des sucres ; c'est d'ailleurs pour ces raisons qu'elle a été modifiée en 1950. Si nous avons maintenu son étude dans ce travail malgré ses imperfections bien connues, c'est précisément pour faire ressortir les résultats également excédentaires que fournissent les méthodes colorimétriques.

Ces dernières ne sont pas suffisamment spécifiques ; elles pèchent par leur mode de défécation. Par exemple, les acides tartrique et malique interfèrent légèrement dans la technique proposée par REBELEIN. L'oxydation cérique à 65°C attaque très légèrement ces acides. Ainsi en solution pure ou par addition à un vin, un taux de 1 g par litre de chacun de ces acides entraîne une augmentation de la teneur apparente en acide lactique de l'ordre de 1 méq par litre. Pour cette raison la méthode de REBELEIN nous a donné des résultats trop élevés de 0,27 g par litre, si l'on considère la moyenne générale des déterminations.

Dans la méthode de SCHAELDERLE et HASSELMANN, le butanediol-2,3 n'est pas éliminé ; une addition par litre de vin de 1 g de ce corps entraîne une augmentation de 0,36 g de la valeur trouvée pour l'acide lactique ; d'autre part, la présence de fructose perturbe le dosage et l'essai témoin pratiqué ne suffit pas à corriger la totalité de son interférence ; la présence d'acides aminés peut également entraîner une surcharge.

Ce n'est pas la technique colorimétrique qui est en cause, mais l'insuffisance de l'épuration préalable. La colorimétrie donnerait certainement d'excellents résultats si on l'appliquait après une défécation conduite par exemple selon la méthode de DIMOTAKI-KOURAKOU. La colorimétrie directe fournit généralement des résultats plus fidèles que la volumétrie, surtout après une séparation par distillation ; une méthode colorimétrique pourrait être mise au point sur cette base.

Les méthodes de PEYNAUD et CHARPENTIÉ et de DIMOTAKI-KOURAKOU ont donné pour 20 vins sur 24 des résultats qui ne s'écartaient pas entre eux de plus de 0,1 g par excès ou par défaut. Mais pour quatre vins de la récolte 1963, la première méthode a toujours donné des résultats plus faibles, de 0,32 g à 0,84 g suivant les vins. Il s'agit du vin rouge n° 6 du tableau 1 et des vins blancs n° 15, 18 et 19 du tableau 2 ; c'est le dernier vin qui a servi également à l'étude statistique de la fidélité des méthodes. Des erreurs de manipulation ne sont pas en cause, puisqu'on a recommencé de nombreuses fois les dosages. Il ne nous a pas été possible de trouver une explication à ces écarts. Il s'agit bien d'un résultat déficitaire. Le dosage enzymatique de l'acide *l* (+) lactique, dont on connaît la grande spécificité, donne en effet dans ce cas des résultats plus élevés que cette méthode.

A quelques exceptions près concernant surtout les vins liquoreux, la méthode de PEYNAUD et CHARPENTIÉ reste une bonne méthode pour le travail en série et pour des dosages courants. Dans un travail plus précis, on devra cependant tenir compte de la possibilité d'un léger déficit accidentel suivant la nature des vins analysés. On lui préfèrera alors la méthode de DIMOTAKI-KOURAKOU qui s'appuie sur un mode parfait de défécation et qui livre des valeurs plus sûres. La fidélité des deux méthodes est du même ordre.

Un des buts de cette étude était de choisir la méthode la meilleure pour doser l'acide lactique total dans un vin ou un milieu fermenté, de manière à déterminer les taux respectifs des deux stéréo-isomères de l'acide lactique, l'acide *l* (+) lactique étant obtenu par dosage enzymatique direct. Nous sommes arrivés à la conclusion pratique que la certitude sur la teneur en acide lactique total ne pouvait être obtenue que par l'application comparative des méthodes de PEYNAUD et CHARPENTIÉ d'une part, et de DIMOTAKI-KOURAKOU d'autre part.

Reçu pour publication en juillet 1966.

SUMMARY

A COMPARISON OF SOME METHODS OF DETERMINING LACTIC ACID IN WINES

The authors compared five chemical methods of determining lactic acid, applying them to twenty-four different wines.

The reliability and precision of each of these methods was determined by statistical analysis of eight successive results obtained from the same wine. The method shown to be the most reliable consists in fixing the lactic acid on an anionic resin and its oxidation by ceric ions in acetaldehyde. The colorimetric methods were discarded because of the inadequacy of the purifying techniques.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CASAS-LUCAS J. F., 1954. Determinacion del acido lactico por oxidacion con sulfato cerico. *Ann. Real Soc. Esp. Fisica y Quim*, **50**, 535.

CORDONNIER R., BIZEAU C., 1960 Séparation par chromatographie d'échange d'ions et dosage des acides lactique, succinique et malique du vin. *Ann. Technol. agric.*, **9**, 349.

COURTOISIER A. J., RIBÉREAU-GAYON J., 1963. Étude de la séparation par chromatographie d'échange d'ions et du dosage des acides lactique, malique et tartrique. *Bull. Soc. Chim.*, 350.

DIMOTAKI-KOURAKOU V., 1960. Dosage de l'acide lactique à l'aide des échangeurs d'ions. *Ann. Falsif. Exper. chim.*, **53**, 569.

DIMOTAKI-KOURAKOU V., 1966. Remarques sur les méthodes de dosage de l'acide lactique. O. I. V., méthode analytique n° 204.

FRIEDEMANN T. E., GRAESER J. B., 1933. Determination of lactic acid. *J. biol. Chem.*, **100**, 291.

GAROGLIO P. G., GIANNARDI G. B., 1965. Sulla determinazione contemporanea colorimetrica dell'acido tartarico, lattico e malico nel vino e nel mosto secondo il metodo di REBELEIN. *Rivista Vitic. Enol.*, **18**, 476.

HENNIG K., LAY A., 1964. Vergleich verschiedener Verfahren zur Bestimmung der Milchsäure. *Weinb. u. Keller*, **11**, 429.

KAIN W., SCHNEYDER J., 1964. Procédé rapide de détermination de l'acide lactique dans les vins de consommation courante. O. I. V. méthode analytique n° 150.

KOCH J., BRETTHAUER G., 1951. Über eine zuverlässige Methode zur Bestimmung der Milchsäure in Süssmost und Wein. *Z. anal. Chemie*, **5**, 346.

MICHEL A., 1931. Dosage de l'acide lactique dans les vins. *Ann. Falsif. Fraudes*, **24**, 471.

PEYNAUD E., 1947. Contribution à l'étude biochimique de la maturation du raisin et de la composition des vins. *Ind. aliment. agric.*, **64**, 303.

PEYNAUD E., CHARPENTIÉ Y., 1950. Note sur le dosage de l'acide lactique dans les boissons fermentées. *Ann. Falsif. Fraudes*, **43**, 246.

RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., 1937. L'acide lactique dans les vins de Bordeaux. *Ann. Falsif. Fraudes*, **30**, 339.

SCHAELDERLE D., HASSELMANN M., 1961. Application de la réaction d'EEGRIVE au dosage de l'acide lactique dans le vin. *Ann. Falsif. Exper. chim.*, **53**, 569.

Ann. Technol. agric., 1966, **15** (3), 311-320.

FERMENTATION DU JUS DE RAISIN EN CONTINU

ÉTUDES DE LABORATOIRE

M. FLANZY, P. DUPUY, C. POUX et P. ANDRÉ.

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, 11 - Narbonne,
Station de Technologie végétael, 84 - Montfavet.
Station de Technologie végétale, 78 - Versailles

SOMMAIRE

Les expériences qui sont décrites ont pour but de déterminer l'efficacité technologique de certaines interventions, en vue de lutter contre l'infection bactérienne qui peut se développer au cours de la vinification en continu.

On a jugé que, dans le cas de la vinification en continu, les phénomènes microbiologiques (fermentation alcoolique, fermentation malolactique, piqûre lactique) devaient dans une très large mesure être indépendants des phénomènes de macération. Les renseignements que l'on obtiendra sur ce point en observant la fermentation de jus de raisins seront donc très vraisemblablement valables pour la fermentation de la vendange entière.

Il est facile de réaliser au laboratoire de petits appareils de fermentation en continu fonctionnant avec du jus de raisin, dans lesquels les divers facteurs peuvent être réglés avec une grande souplesse. C'est avec de telles installations, ayant des capacités de 3 et de 9 litres, que nous avons travaillé.

APPAREILS ET MÉTHODES

Deux cuves de fermentation ayant la même forme ont été utilisées dans ce travail, elles ne diffèrent que par leurs dimensions (fig. 1).

La cuve A est constituée par un cylindre en matière plastique (h = 50 cm ; ⌀ = 10 cm) fermé à la partie inférieure. Des robinets (3) placés à diverses hauteurs permettent de prélever les échan-

tillons nécessaires aux analyses. Cette cuve contient 3 litres de liquide. A la partie supérieure une ouverture latérale (2) permet le débordement du liquide fermenté qui est recueilli dans une éprouvette. Le haut du cylindre est clos par un bouchon en liège paraffiné portant un thermomètre (5)

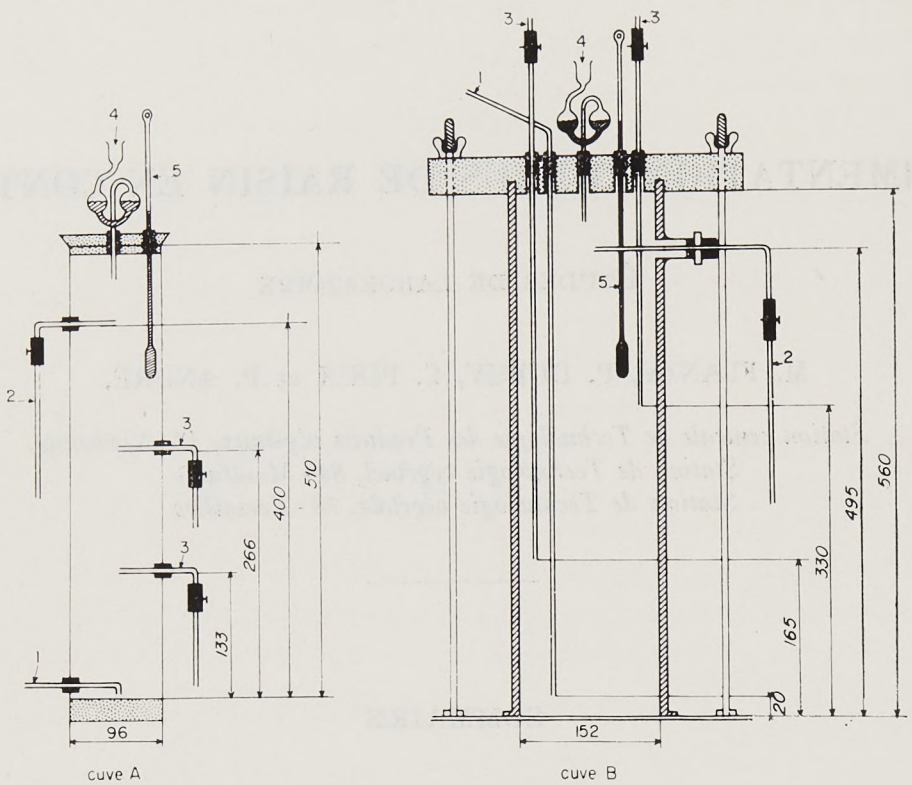


FIG. 1. — *Cuves de fermentation.*

et un barbotteur à boules (4) pour l'échappement des gaz de fermentation.
La cuve B, équipée de la même façon, est en verre (h = 56 cm ; ⌀ = 15 cm), le volume occupé par le liquide est de 9 litres.

Dans les deux appareils, l'introduction du moût frais est réalisée en bas du cylindre (1) au moyen d'une pompe péristaltique à débit variable. Le pompage est interrompu pendant la nuit.

La température est maintenue à la valeur désirée, soit par circulation d'eau thermostatée à l'extérieur de la cuve, soit en plaçant l'appareil dans un local à température constante.

Des déterminations chimiques, suivant les méthodes indiquées par JAULMES (1951) ont été faites chaque jour sur le moût fermenté sortant de l'appareil. L'acidité volatile a été dosée par acidimétrie après entraînement à la vapeur d'eau, l'acétaldéhyde par la méthode JAULMES-ESPEZEL, l'acide sulfureux libre et combiné par la méthode de RIPPER. Les levures ont été comptées avec un compte-globules. L'examen microscopique à fort grossissement a permis de déterminer la proportion des bactéries par rapport aux levures.

RÉSULTATS

EXPÉRIMENTATION A

La cuve A a été alimentée pendant 45 jours avec du jus de raisin *Seibel* 4986. Ces raisins provenaient de deux récoltes successives dans deux parcelles voisines, ils étaient à des états de maturité différents. Comme le but de cette expérience était de voir quels sont les moyens d'action contre la piqûre lactique, on a diminué l'acidité du jus par addition de potasse. On a ainsi obtenu des jus dont le pH compris entre

3,5 et 3,6 est très favorable au développement des bactéries. Suivant les récoltes, les teneurs en sucre étaient de 155 et de 169 g/l.

Au début de l'expérience, la cuve remplie de jus de raisin est entrée spontanément en fermentation. Tous les jours, entre 10 et 18 heures, du jus frais est introduit dans l'appareil et diverses déterminations sont effectuées sur le moût qui en est extrait. Le plus souvent ces dosages sont faits sur deux échantillons différents, à savoir : les 100 premiers ml qui débordent après la mise en route quotidienne de la pompe, et les 100 derniers qui sont recueillis chaque soir avant d'arrêter la pompe. Suivant la vitesse de fermentation observée, on introduit des quantités différentes de jus en faisant varier le débit de la pompe.

L'acide sulfureux est ajouté sous forme d'une solution concentrée de métabisulfite de potassium au moment où l'on commence l'introduction quotidienne du jus frais.

1. *Effet de l'acide sulfureux introduit dans la fermentation continue*

a) *Répartition de l'acide sulfureux dans le fermenteur.*

Dans l'appareil utilisé, l'introduction d'une solution sulfureuse concentrée au fond de la cuve, au moyen de la pompe, ne provoque pas sa répartition rapide dans la masse en fermentation. Pour y parvenir, il est nécessaire d'introduire la solution dans le tiers supérieur de l'appareil. Le tableau 1 donne les résultats d'une telle

TABLEAU 1

Répartition du SO_2 dans le fermenteur

Durée écoulée après l'introduction (min)	Prélèvement	SO_2 libre en mmol/l	SO_2 total en mmol/l
30	Haut	2,08	3,88
	Milieu	1,95	3,81
	Bas	1,87	3,77
		moyenne : 1,97	moyenne : 3,81
185	Haut	1,41	3,25
	Milieu	1,41	3,20
	Bas	1,45	3,10
		moyenne : 1,42	moyenne : 3,19
380	Haut	0,87	2,75
	Milieu	0,90	2,80
	Bas	0,80	2,75
		moyenne : 0,86	moyenne : 2,76

15 ml d'une solution contenant 11,9 mmole de SO_2 sont introduits à la pipette dans le tiers supérieur de l'appareil A. Aux temps indiqués les échantillons sont prélevés par les 3 robinets du haut, du milieu et du bas. Vitesse d'apport du jus frais 145 ml/h.

opération. On observe qu'après 30 minutes, l'acide sulfureux est réparti d'une façon homogène. La diminution de la concentration en sulfite, que l'on constate avec le temps, est due à la dilution que provoque l'introduction continuelle du jus frais.

b) *Vitesse de combinaison de l'acide sulfureux.*

Dans le moût en fermentation, l'acide sulfureux présente deux types de combinaisons particulièrement importantes. Celle avec l'acétaldéhyde est très stable, $K = 2{,}4 \cdot 10^{-6}$ M, et elle se réalise rapidement au pH du vin. En effet, d'après KIELHÖFER (1958), cette réaction est effectuée à 98 p. 100 au bout de 90 minutes. L'acétaldéhyde étant toujours présent à la dose de 20 à 30 mg/l dans le fermenteur, une partie de l'acide sulfureux va être engagée dans cette combinaison.

La combinaison avec les sucres est moins rapide que celle avec l'acétaldéhyde. Il faut attendre 4 à 5 heures pour atteindre l'équilibre à 30°, température à laquelle est réglée la fermentation. La combinaison ainsi formée a une constante de $K = 0{,}8$ M.

Le jus de raisin contient beaucoup de glucose et de lévulose et seulement des traces d'acétaldéhyde. Le moût en fermentation contient moins de glucose et de lévulose, mais des quantités appréciables d'acétaldéhyde et d'autres composés inter-

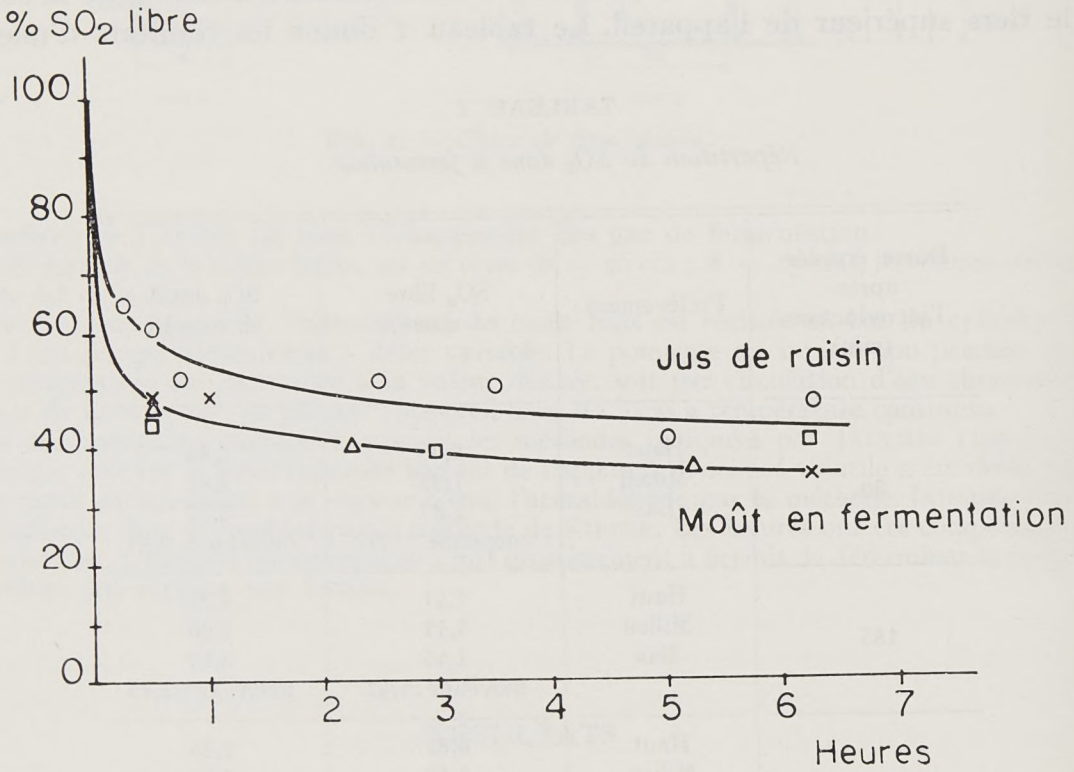


FIG. 2. — *Combinaison de l'acide sulfureux dans le jus de raisin et le moût en fermentation*

médiaires à fonctions aldéhydiques et cétoniques qui peuvent se combiner avec l'acide sulfureux. Il était donc intéressant de chercher à comparer les vitesses de combinaison de l'acide sulfureux dans les deux milieux. Les résultats sont réunis dans la figure 2.

On constate que la combinaison de l'acide sulfureux est un peu plus rapide dans

le moût en fermentation que dans le jus de raisin. A l'équilibre on a environ 43 p. 100 d'acide sulfureux libre dans le jus et 35 p. 100 dans le moût considéré.

c) *Relation entre l'acide sulfureux libre et combiné.*

La relation entre l'acide sulfureux libre et combiné est définie dans un vin donné par les indices T et R proposés par MOREAU et VINET. Nous avons voulu savoir si une relation analogue est respectée dans le moût en fermentation continue. L'acide sulfureux étant introduit dans le fermenteur au début de la journée, nous avons admis, comme la figure 2 nous y autorise, que l'équilibre est pratiquement atteint après 6 heures à 30°.

Nous avons constaté que la quantité d'acide sulfureux libre dépend beaucoup de la quantité d'acétaldéhyde présent dans le milieu. En effet, lorsqu'on ajoute chaque jour de l'acide sulfureux, de l'aldéhyde s'accumule en quantité de plus en plus importante. Lorsque tout l'acide sulfureux est combiné, l'acétaldéhyde continue à s'accumuler. On peut attribuer ce phénomène à ce que la combinaison qui se forme avec l'acétaldéhyde est plus stable que celle qui existe avec le glucose, il est donc normal qu'elle tende à se substituer à cette dernière.

Le tableau 2 permet aussi de voir ce qui se passe lorsqu'on répète les additions d'acide sulfureux pendant plusieurs jours consécutifs. On constate une augmentation de la quantité d'acétaldéhyde. La teneur maximale est atteinte 3 jours après la plus forte concentration en acide sulfureux. L'acétaldéhyde s'accumule en quantité supérieure à celle qui est nécessaire pour combiner tout l'acide sulfureux.

TABLEAU 2

Évolution de l'acétaldéhyde après addition quotidienne de SO_2

Dates	Addition SO_2	SO_2 en mmol/l			Acétaldéhyde en mmol/l	Densité à la sortie	Ac. volatils méq/l
		Total	Libre	Combiné			
14-11	0	1,0	0	1,0	0,85	1,029	53
15-11	+	2,8	0,9	1,9	1,4	1,025	40
16-11	+	5,2	1,9	3,3	1,9	1,031	36
17-11	+	7,2	2,7	4,5	2	1,040	29
18-11	+	6,8	2,7	4,1	2,7	1,046	20
19-11	0	5,3	1,7	3,6	3,4	1,048	19
20-11	0	4,0	0	4,0	6,7	—	18
21-11	0	3,2	0	3,2	4,3	1,018	17
22-11	0				4,0	1,009	12

Les résultats se rapportent aux dosages réalisés sur le moût évacué de l'appareil en fin de journée. Appareil maintenu à 30-31° et alimenté avec le jus de raisin pH = 3,55 — sucre 170 g/l.

d) *Efficacité microbiologique de l'acide sulfureux.*

Il est important de savoir si l'acide sulfureux est capable de s'opposer efficacement à la croissance et à l'activité des bactéries indésirables. Dans le cas de fer-

mentation en continu le seul accident microbiologique possible paraît être la piqûre lactique, qui peut être appréciée par l'augmentation de l'acidité volatile.

Le tableau 3 indique comment il a été possible de ramener à des conditions normales de fonctionnement un appareil qui était fortement infecté par des bactéries lactiques. L'acide sulfureux arrête la multiplication des levures et des bactéries. La fermentation alcoolique est ralentie tant qu'il y a de l'acide sulfureux libre. Lorsque l'addition quotidienne cesse, le moût en fermentation ne contient plus d'acide sulfureux libre et la fermentation reprend son rythme habituel. L'acidité volatile retombe alors à un niveau qui correspond à celui d'une fermentation alcoolique normale.

TABLEAU 3

Action de l'acide sulfureux sur la piqûre lactique

Date	Addition de SO_2	SO_2 en mmol/l		Ac. volatils méq./l	Levures 10^6	Bactéries par ml	Densité à la sortie	Volume (ml) introduit par jour
		Libre	Combiné					
25–10	0	0	0	4,7	51	0,01	1,016	260
26–10	0	0	0	12,3	76	32	1,002	860
27–10	+	4,1	1,2	40	60	150	1,006	800
28–10	+	4,8	1,8	15	33	120	1,016	1 300
29–10	+	2,3	4,1	10,5	32	39	1,036	1 200
30–10	0	0	3,8	5,3	—	—	1,030	1 040
31–10	0	—	—	—	—	—	1,005	1 070
1–11	0	0	1,8	7	62	30	1,000	1 500

Les concentrations sont celles mesurées sur le moût évacué de l'appareil au début de la journée. Les jours où du SO_2 a été introduit, les valeurs indiquent l'équilibre atteint 3 heures après cette addition.

Le pH du moût en fermentation était 3,65. L'appareil maintenu à 30°–31°C et alimenté avec du jus de raisin pH = 3,5 — sucre 155 g/l.

On peut donc conclure de cet essai que pour éviter une augmentation de l'acidité volatile, il sera nécessaire d'intervenir par une dose massive d'acide sulfureux maintenue pendant deux ou trois jours selon la gravité de l'infection. L'effet curatif de ce traitement se maintient après que l'acide sulfureux libre ait disparu de l'appareil.

2. *Population de levures*

L'appareil de fermentation en continu est resté en fonctionnement ininterrompu pendant 45 jours. Au cours de cette période on n'a effectué aucune aération. Le seul oxygène pouvant être introduit dans le milieu est celui apporté par le jus de raisin qui est pompé chaque jour dans la cuve de fermentation. Ce jus présentant une légère casse oxydasique, il est très vraisemblable que l'oxygène qui s'y est dissous s'est rapidement combiné et nous pouvons penser que la quantité d'oxygène introduite a été très faible et peut-être même nulle. Malgré cela, la population de levures s'est maintenue presque constante depuis le début jusqu'à la fin de l'expérience. On a

enregistré pendant trois jours consécutifs au début de l'expérience 51, 76 et $60 \cdot 10^6$ cellules/ml et l'on avait encore 53, 56 et $50 \cdot 10^6$ cellules/ml les trois derniers jours de l'expérience. Il faut noter qu'entre temps la cuve avait reçu 10 additions de SO_2 et avait été maintenue 9 jours à 37°.

Il est remarquable de constater que malgré ces changements le nombre de levures est très peu variable. Il semble que dans les conditions de la fermentation en continu un apport d'oxygène gazeux ne soit pas indispensable pour conserver indéfiniment une concentration normale en cellules de levures.

3. *Influence de la température*

Il n'a pas été possible de déterminer la température permettant la vitesse de fermentation maximale dans l'appareil. Cependant, nous pouvons déjà dire que la température de 30° est plus favorable que celle de 37°. Bien qu'à cette température la quantité de jus quotidiennement introduite dans l'appareil soit à peu près la moitié de celle introduite à 30°, la fermentation alcoolique est très lente, comme le montre la très faible diminution de densité enregistrée pendant la nuit, période où il n'est fait aucun apport de jus dans l'appareil.

Il est intéressant de noter que cette température élevée gêne encore davantage la production d'acide acétique par les bactéries lactiques. D'après cette expérience, il semble bien que les températures élevées ne soient pas par elles-mêmes favorables à l'apparition de la piqûre lactique dans le cas de fermentation continue. En effet, cette partie de l'essai a commencé alors que le produit sortant du fermenteur avait une densité de 1,011 et 13 méq./l d'acidité volatile. Dix jours après, au moment où l'expérience a pris fin la densité n'avait pas changé mais l'acidité volatile était descendue à 4,8 méq./l.

Expérimentation B

Cette deuxième expérience a été faite dans un appareil en verre de 9 litres de capacité. Son alimentation en moût est réalisée à partir de raisins *Carignan* stockés en frigorifique. Chaque jour un lot de raisins est pressé pour fournir le jus nécessaire. Par suite du stockage des raisins au froid, la composition du jus a légèrement varié au cours de l'essai. Il contenait 190-195 g/l de sucre, son acidité totale était de 102 méq./l et son pH naturel qui n'a pas été modifié était de 3,35. Cette composition correspond à celle de jus de *Carignan* normaux.

1. *Fermentation et population de levures*

La fermentation, conduite à la température de 25°-26°, est suivie en mesurant la densité du liquide fermenté sortant de l'appareil. Pendant les 40 jours de fonctionnement, on a réglé l'apport journalier du jus de façon à évacuer des liquides dont la densité est comprise entre 1,000 et 1,030.

On a calculé la quantité de sucre fermenté chaque jour qui est comprise entre les valeurs extrêmes de 28 et 57 g/litre et par 24 heures, la moyenne étant de 40,7 g/l. Ces valeurs journalières se répartissent autour de la moyenne selon l'histogramme de la figure 3.

Pendant les 10 premiers jours de marche de l'appareil, la densité se maintient au-dessus de 1,020 et la population de levures reste élevée, autour de $120 \cdot 10^6$ par ml. On remarque une alternance dans la distribution des levures entre le haut et le bas de l'appareil. Le matin, les levures se trouvent en quantité plus importante au bas de la cuve et le soir, après le pompage du jus frais, il y en a davantage dans le haut. Tout se passe comme si les levures étaient entraînées par le courant qui sort de l'appareil. Ensuite, lorsque la densité de la cuve oscille entre 1,010 et 1,015, le nombre de levures baisse autour de $80 \cdot 10^6$. A ce moment-là, les levures sont plus nombreuses au bas de la cuve. Le taux de multiplication des levures est variable

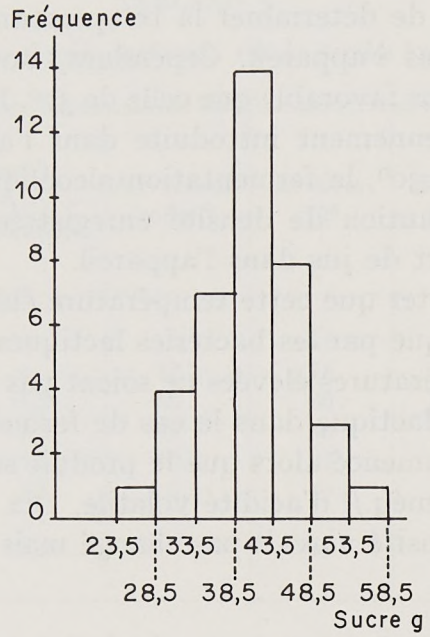


FIG. 3. — *Quantité de sucre fermenté chaque jour dans la cuve B. Fréquence des valeurs observées*

et augmente en même temps que la quantité de jus frais introduit quotidiennement (2 à 3 l) dans l'appareil. Les levures entraînées avec le liquide sont rapidement remplacées par suite de la multiplication de la population restante. Comme dans le cas des cultures strictement continues étudiées par MONOD (1950), le taux de croissance est sensiblement proportionnel au taux de dilution du jus introduit dans l'appareil.

2. *Contamination et action de l'anhydride sulfureux*

L'acidité volatile après 20 jours de fonctionnement de l'appareil sans acide sulfureux, s'est élevée à 12 méq./l. Cette élévation de l'acidité volatile coïncide avec le développement d'une flore bactérienne qui a été dénombrée par comptage sous le microscope. Des additions d'acide sulfureux, 100 mg/l pendant 3 jours et 150 pendant 8 jours, stabilisent la production de l'acidité volatile à ce niveau. Il a fallu introduire du jus sulfité à 200 mg/l pour ramener l'acidité volatile à 8 méq./l. Dans ces conditions, le nombre de bactéries diminue fortement et l'acide malique réapparaît dans le vin sortant de l'appareil.

La figure 4 donne les résultats des comptages de levures et de bactéries ainsi que l'évolution de l'acidité volatile durant une période de l'expérimentation (du 19 oct. au 10 nov.).

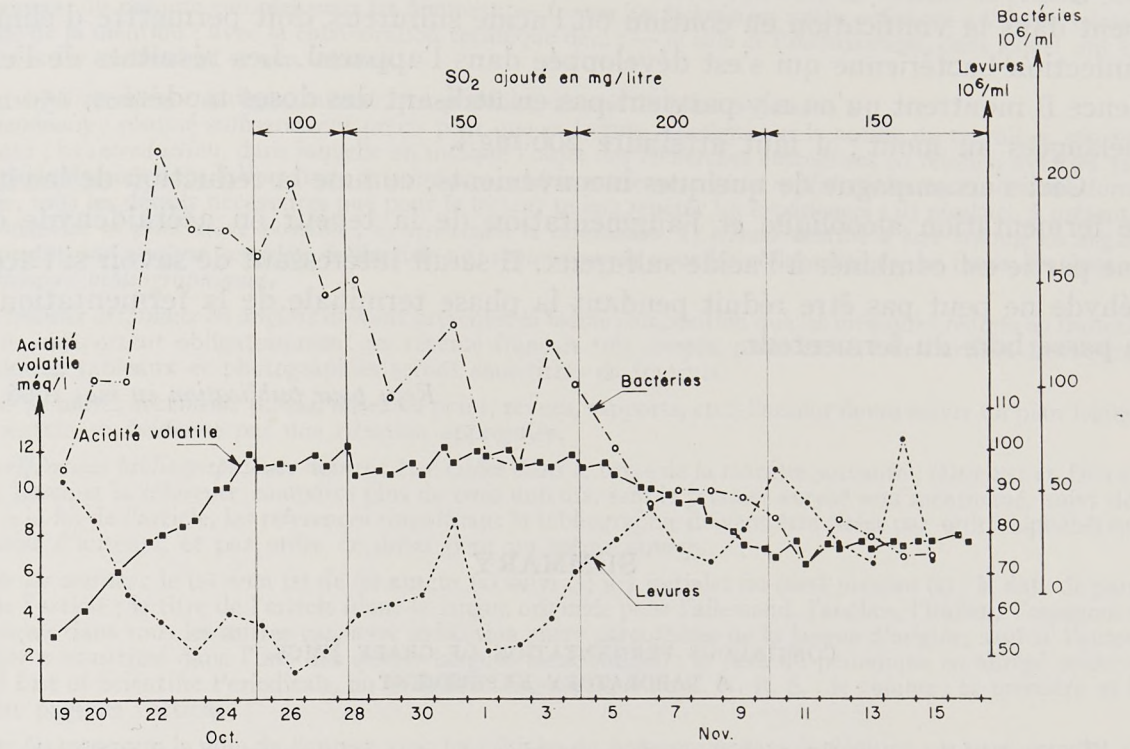


FIG. 4. — *Évolution des levures, des bactéries et de l'acidité volatile dans les cuve B*

On peut remarquer l'action de l'anhydride sulfureux à des doses différentes. De même, l'action antagoniste de deux populations de germes différents dans le milieu est mise ici en évidence, ainsi que la diminution de la population de levures, lorsque la contamination en bactéries malolactiques est maximum. Avec la diminution de la population bactérienne, sous l'action du SO_2, on voit remonter la population de levures.

DISCUSSION

Les deux essais que nous rapportons diffèrent surtout par les caractéristiques du jus de raisin. Dans l'une, le pH du jus a été volontairement relevé à 3,5-3,6 pour faciliter le développement des bactéries lactiques. Ces conditions ont amené l'implantation d'une flore lactique extrêmement active à cause du pH élevé et de la faible teneur en alcool. Cette activité s'est traduite par une production d'acides volatils de 40 méq./l jamais atteinte dans la pratique.

L'autre essai se rapproche davantage des conditions rencontrées dans la pratique œnologique. Les conditions du milieu étant moins favorables par suite de la teneur en alcool plus élevée et du pH bas, il y a eu dans cet essai beaucoup moins d'acidité volatile formée : 12 méq./l. Malgré cela les bactéries lactiques se sont développées très fortement atteignant un nombre tout aussi élevé que dans le premier essai.

Le développement bactérien est antérieur d'au moins 48 h à l'apparition d'une

teneur exagérée en acidité volatile. Ces circonstances laissent le temps d'intervenir en introduisant de l'acide sulfureux dans le fermenteur. Dans le cas de la vinification discontinue, on a intérêt à introduire l'acide sulfureux dans la vendange, puisqu'il va agir d'une façon préventive sur la contamination naturelle. Il en est tout autrement dans la vinification en continu où l'acide sulfureux doit permettre d'éliminer l'infection bactérienne qui s'est développée dans l'appareil. Les résultats de l'expérience B montrent qu'on n'y parvient pas en utilisant des doses modérées, 150 mg/l, mélangées au moût ; il faut atteindre 200 mg/l.

Ceci s'accompagne de quelques inconvénients, comme la réduction de la vitesse de fermentation alcoolique et l'augmentation de la teneur en acétaldéhyde dont une partie est combinée à l'acide sulfureux. Il serait intéressant de savoir si l'acétaldéhyde ne peut pas être réduit pendant la phase terminale de la fermentation qui se passe hors du fermenteur.

Reçu pour publication en mai 1966.

SUMMARY

CONTINUOUS FERMENTATION OF GRAPE JUICE.
A LABORATORY EXPERIMENT

Two experiments on the continuous fermentation of grape juice were carried out in the laboratory in order to study the microbiological peculiarities which can be encountered in continuous vinification. The conditions of the first experiment (high pH, low sugar content) were chosen in order to cause considerable activity of the lactic bacteria during alcoholic fermentation. The second experiment concerns the conditions of enological practice.

It was possible to show that a large multiplication of the lactic bacteria preceded by two days an increase in volatile acidity. If sulfur dioxide is introduced at a concentration higher than that which is used at present, the production of volatile acidity can be stopped. The rate of combination of the sulfur dioxide and the quantities combined are slightly greater in the must in fermentation than in the grape juice. The addition of sulfur dioxide causes the accumulation of acetaldehyde and decreases the rate of alcoholic fermentation.

Experiments continued for 40 days showed that aeration was not indispensable for maintaining a sufficient yeast population.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

JAULMES P., 1961. Analyse des vins.

KIELHÖFER E., 1958. *Weinberg u. Keller*, **5**, *461-76*.

MONOD J., 1950. *Ann. Inst. Pasteur*, **79**, 390.

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le manuscrit doit être dactylographié sur papier format 21 × 27, avec un double interligne, au recto seulement. Chaque page sera numérotée et des feuilles séparées seront utilisées pour les références bibliographiques, les tableaux, les légendes des figures et graphiques, etc.

Au début de chaque mémoire, on indiquera : — *le titre du mémoire :* il ne devra pas comporter d'abréviations ni de formules chimiques (sauf pour les isotopes) : — *le nom des auteurs*, précédé des initiales du prénom pour les hommes, du prénom complet pour les femmes ; — *le nom des techniciens* ayant collaboré à l'étude relatée, précédé de la mention : avec la collaboration technique de... ; — *le nom de l'établissement*, dans lequel ont été effectuées les recherches et son adresse.

Les mémoires seront rédigés, autant que possible, d'après le plan ci-dessous :
a) *sommaire :* résumé suffisamment précis pour que sa lecture renseigne sur la nature du travail et son importance ; b) *introduction*, dans laquelle on indique l'objet des recherches entreprises en relation avec les travaux déjà effectués dans le domaine ; c) *techniques expérimentales et matériel utilisé*, en donnant, sous une forme concise, tous les détails nécessaires que pour le lecteur puisse répéter les expériences ; d) *résultats*, à présenter de la manière la plus brève possible ; e) *discussion et conclusion ;* f) *résumé* destiné à être traduit en anglais comportant une analyse *complète* de l'article ; g) *remerciements* pour les collaborations, les fonds, les dons... ; h) *références bibliographiques.*

Les travaux originaux en anglais doivent présenter la même composition que les mémoires rédigés en français, mais ils comportent obligatoirement un résumé français très *complet* placé en tête de l'article. Les figures, graphiques, tableaux et photographies seront sous-titrés en français.

Pour les autres documents (notes, mises au point, revues, rapports, etc.) l'auteur devra suivre un plan logique et le mettre en évidence par une titration appropriée.

Les références bibliographiques doivent être citées dans le texte de la manière suivante : (DUPONT et DUVAL, 1954). Lorsque la référence comporte plus de trois auteurs, seul le premier auteur sera mentionné, suivi de : et *al.* A la fin de l'article, les références constituant la bibliographie doivent être citées par ordre alphabétique des noms d'auteurs, et par ordre de dates pour un même auteur.

Pour les articles : le (s) nom (s) de (s) auteur (s) suivi (s) des initiales du (des) prénom (s) ; la date de parution de l'article ; le titre de l'article (dans la langue originale pour l'allemand, l'anglais, l'italien, l'espagnol et en français dans tous les autres cas, avec indication entre parenthèses de la langue d'origine, sauf si l'auteur étranger a sous-titré dans l'une des quatre langues mentionnées) ; le titre du périodique en abrégé selon la World List of Scientific Periodicals, ou le Bulletin Signalétique du C. N. R. S. ; le volume ; la première et la dernière page de l'article.

Pour les ouvrages : le nom de l'auteur avec les initiales du prénom ; la date de l'édition ; le titre complet de l'ouvrage dans la langue originale, sans abréviations (pour les langues utilisant des alphabets autres que l'alphabet latin, la traduction du titre sera donnée entre parenthèses, avec mention de la langue d'origine) ; le volume ; la première et la dernière page du paragraphe se rapportant aux résultats discutés, et, si l'on cite l'ouvrage en entier, le nombre de volumes et le nombre total de pages ; le numéro de l'édition s'il y en a plusieurs ; le nom de l'éditeur ; le lieu de l'édition. Si l'ouvrage est collectif, on indiquera en plus le nom de l'auteur du chapitre cité, le nom des rédacteurs principaux, précédé de la mention « in », le titre de l'ouvrage.
La mention de « communications personnelles » ou « données non publiées » etc. doit être faite entre parenthèses. Lorsque l'auteur a relevé une référence dans une revue d' « Abstracts », le mentionner à la fin de la référence, entre parenthèses.

Les tableaux, dessins, graphiques, cartes, photographies, doivent être fournis à part. Les tableaux et figures doivent faire l'objet de deux numérations distinctes, en chiffres arabes l'une et l'autre.
Les auteurs peuvent disposer leurs tableaux soit dans le sens de la largeur de la revue, soit dans le sens de la longueur. Dans le sens de la largeur, le total des signes et des espaces disponibles est de 100. Dans le sens de la longueur, il est de 155. Les tableaux en longueur, c'est-à-dire ceux pouvant disposer de 155 signes, ne seront admis que s'ils comprennent plus de 8 lignes de chiffres, de manière qu'une page entière de la revue ne soit pas occupée par un tableau très long et très étroit.
Les graphiques ne doivent pas faire double emploi avec les tableaux.
Les légendes et les énoncés des graphiques et dessins doivent être dactylographiés sur feuille séparée, et porter les numéros des figures.

Les graphiques, schémas, cartes, dessins d'appareils seront envoyés *à l'état de projets*, leur exécution définitive étant confiée au Bureau de Dessin de l'I. N. R. A. Seules deux réductions à l'impression sont admises : *soit* × 0,5. *soit* × 0,25.
Il est rappelé que le format utile des Annales est : 19 × 12,5 cm ; ces dimensions ne doivent pas être dépassées

Photographies : Il est recommandé de fournir des épreuves bien contrastées sur papier blanc, et de préférence en format 9 × 12. Si les photographies doivent être associées pour constituer des planches, on adoptera les normes suivantes : 2 photos 9 × 12, 4 photos 9 × 5,5, 6 photos 5,5 × 5,5. Dans ce cas, chaque photo devra porter un numéro en chiffres arabes visible après clichage.
Les légendes des photographies doivent être dactylographiées sur feuilles séparées et porter les numéros des figures.

Correction des épreuves : les auteurs recevront deux épreuves à corriger. Les corrections « d'auteur » ne sont autorisées que sur le premier jeu d'épreuves.

Envoi du manuscrit : M. FLANZY, Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne (Aude) France, ou M. MOCQUOT, Station centrale de Technologie des Produits animaux, Jouy-en-Josas. (Seine-et-Oise). Envoyer deux exemplaires.

Le Directeur-Gérant : M. L CAGNAG

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 1-1967

Dépôt légal : 1er trimestre 1967. *N° d'impression : 1557*

ANNALES
DE
TECHNOLOGIE
AGRICOLE

VOLUME 15 1966 NUMÉRO 4

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle - PARIS-7e

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs et de l'Institut national de la Recherche agronomique, à l'exception des sommaires et résumés.

Ann. Technol. agric., 1966, **15** (4), 327-334.

RÉPARTITION DE L'ERGOSTÉROL DANS LES CELLULES DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* PROVENANT DE CULTURES IRRADIÉES

P. DUPUY, J. MAUGENET et J.-N. MORFAUX

Station de Technologie végétale, Route de Saint-Cyr, 78 - Versailles

SOMMAIRE

Les cellules géantes, qui apparaissent dans une population de levures soumise à l'irradiation gamma pendant leur culture, n'ont pas une teneur en stérols différente des cellules plus petites. La même observation est faite chez les cellules de tailles différentes provenant de culture non irradiée. L'étude de la répartition des stérols à l'intérieur des cellules permet de constater que l'ergostérol existe surtout dans les éléments intracellulaires facilement sédimentables.

INTRODUCTION

Dans une publication antérieure (DUPUY, MAUGENET, MORFAUX, 1966), nous avons décrit une augmentation de la teneur en stérols des levures provenant de cultures irradiées. Comme cette augmentation se produit en même temps que l'apparition de cellules géantes, on s'est demandé si ces cellules anormales par la taille n'étaient pas aussi anormales par leur teneur en ergostérol. Des études cytologiques avaient déjà permis de constater que ces cellules géantes contiennent des noyaux qui n'ont pu se diviser ou proviennent de cellules dans lesquelles le cloisonnement ou le bourgeonnement est devenu impossible (MEISSEL et *al.*, 1964). Les changements apparus, à la suite de l'irradiation, dans la distribution du matériel cellulaire nous ont amenés à rechercher dans quelle mesure la répartition des stérols entre les diverses structures de la cellule peut être, elle aussi, modifiée.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Plusieurs des techniques employées ont déjà été décrites dans une publication antérieure (DUPUY, MAUGENET, MORFAUX, 1966).

On a utilisé dans ce travail la souche de *Saccharomyces cerevisiae* CC 53-1 de la collection de notre laboratoire. Les cultures sont faites en fioles agitées, dans un milieu contenant 10 p. 100 de

mélasse et 1 p. 100 de peptone (sauf l'expérience de la fig. 2). L'irradiation, fractionnée en doses de 20 krad données toutes les deux heures, a été effectuée pendant la croissance de la culture. Elle est réalisée en introduisant les fioles de culture dans un irradiateur chargé au ^{60}Co. L'agitation des fioles témoins a été interrompue pendant le même temps.

Le dosage chimique et la séparation chromatographique des stérols, utilisés au cours de ce travail, ont déjà été décrits (MAUGENET, MORFAUX, 1965).

L'azote total a été déterminé après minéralisation par la méthode de Kjeldahl.

L'acide ribonucléique a été dosé suivant la technique recommandée par SCHNEIDER (1957) qui met en jeu la détermination colorimétrique des pentoses. Nous avons observé que des résultats très voisins peuvent être obtenus en mesurant l'absorption à 261 mμ de l'ARN hydrolysé à 75°C dans l'acide perchlorique à 5 p. 100 ; l'ARN de levure « Sigma » a servi de standard pour cette seconde méthode.

Détermination de la taille des cellules

La taille des cellules est mesurée sur les photographies obtenues dans les conditions suivantes : les suspensions de levures prélevées au cours de la culture ou ayant subi une séparation sont diluées dans du formol à 5 p. 100 et montées entre une lame et une lamelle lutée à la paraffine. Les photographies sont obtenues avec un microscope Leitz Aristiphot équipé d'un condensateur de Heine pour contraste de phase, d'un objectif Pv 40/0,70 et d'un oculaire Wild 15 × phot. Les photographies, prises sur film 24 × 36 Kodak tri X, sont agrandies au format 18 × 24 cm ou projetées dans un appareil lecteur de microfilm. Les images des cellules sont mesurées dans leur plus grande dimension à 1 mm près. Les dimensions réelles sont déterminées par comparaison avec la photographie, prise dans les mêmes conditions, d'un micromètre objectif.

Séparation des grosses et des petites cellules

Au cours de la centrifugation, les cellules les plus grosses sont plus rapidement sédimentées que les autres et la répartition par taille n'est pas la même au fond du tube (culot) et dans le haut du tube (surnageant). Le tableau 1 donne les résultats d'une telle séparation obtenue après une seule centrifugation.

TABLEAU I

Efficacité de la centrifugation différentielle pour séparer les cellules suivant leur taille

Classe de tailles	3-4	4-5	5-6	6-7	7-8	8-9	9-10	10-11
Surnageant								
Nombre de cellules mesurées dans chaque classe	30	43	94	27	10			
Pds relatif des diverses classes en %	3,8	12,4	47,4	22,3	14,1			
Culot								
Nombre de cellules mesurées dans chaque classe	11	22	65	74	55	22	5	2
Pds relatif des diverses classes en %	0,5	2,3	13,2	25,1	34,8	16,4	5,0	2,7

Séparation de cellules provenant d'une culture irradiée produite par une centrifugation différentielle de 3 minutes à 30 *g*. Le poids relatif a été calculé en supposant que le poids des cellules est proportionnel au cube de la plus grande dimension.

A la suite de cette constatation nous avons fixé un mode opératoire permettant de séparer des quantités suffisantes de cellules de tailles différentes. Les cellules de levures récoltées après 48 heures de culture sont lavées et mises en suspension dans du tampon phosphate 0,02 M, pH = 6,6. Cette suspension contenant 5.10^8 cellules/ml est soumise à des centrifugations différentielles répétées.

Dans une centrifugeuse Servall refroidie, rotor SS 34, des godets de 50 ml contenant 36 ml de suspension sont centrifugés 3 minutes à 500 t/mn soit environ 30 *g*. Le contenu de ces godets est divisé en trois fractions égales : supérieure, intermédiaire et inférieure, prélevées au moyen d'une pipette manœuvrée avec une poire à aspiration. Les diverses fractions sont réunies dans d'autres godets à centrifuger ou écartées suivant le cas. La figure 1 indique le schéma de ces opérations. Cette technique est très imparfaite mais elle permet de préparer des suspensions enrichies en grosses et en petites cellules. Elle a été appliquée aussi bien aux cultures irradiées que non irradiées.

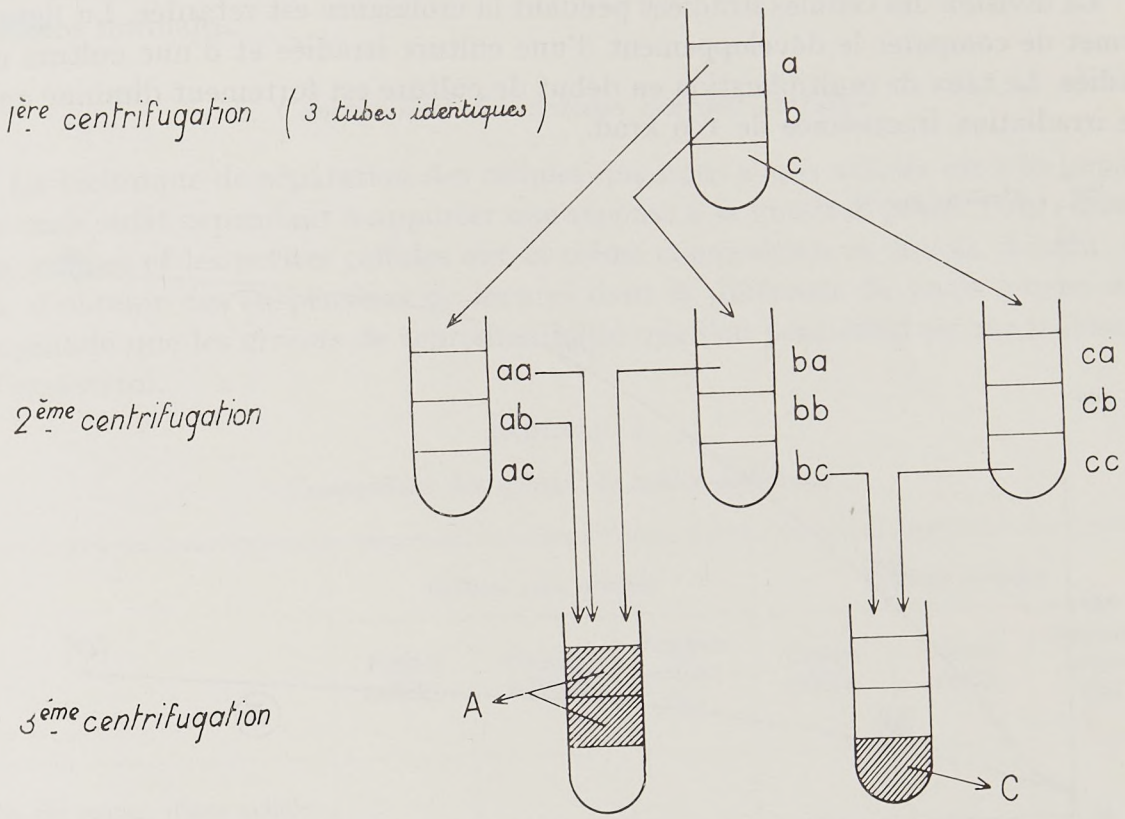


FIG. 1. — *Technique de séparation des levures d'après leur taille*

Fractionnement des cellules

Une suspension contenant 10 ml d'eau, 0,5 g de levures et 6 g de microbilles de verre n° 12 est agitée 15 minutes dans un appareil « Mickle desintegrator ». On dilue en ajoutant 70 ml d'eau et on centrifuge 15 minutes à 1 000 *g*. Le surnageant qui contient les « particules » est mis de côté ; le culot qui contient les gros débris et les cellules entières est soumis à un nouveau traitement de 15 minutes au Mickle. Après une seconde dilution et une seconde centrifugation, on réunit les « particules » à celles précédemment récoltées, et le culot, dilué à 30 ml, est centrifugé 7 minutes à 100 *g* dans des godets coniques. Le surnageant contient des « particules » qui sont ajoutées aux précédentes. Le culot est formé de deux couches, la plus profonde constituée par des microbilles et des cellules entières alors que la couche supérieure, de coloration plus claire, contient les parois cellulaires. Les parois sont entraînées avec de l'eau par des jets de pissette successifs et mises de côté. Les levures du culot sont traitées une troisième fois au Mickle et les opérations de centrifugation répétées.

Les parois cellulaires provenant de ces traitements successifs sont réunies et centrifugées deux fois à 100 *g* pendant 7 minutes. A chaque opération, on élimine les « particules » (surnageant) et les cellules intactes (partie inférieure du culot). Un examen microscopique permet de s'assurer de la pureté de la préparation. Les « particules » provenant des traitements successifs sont centrifugées 15 minutes à 1 000 *g* ce qui permet d'éliminer quelques cellules et quelques parois qui se rassemblent dans le culot. Les « particules » sont enfin recueillies par centrifugation à 30 000 *g* pendant 1 heure, remises en suspension par traitement aux ultrasons, lavées et centrifugées à nouveau.

RÉSULTATS

1. *Variation de la taille des levures sous l'influence de l'irradiation de la culture*

La division des cellules irradiées pendant la croissance est retardée. La figure 2 permet de comparer le développement d'une culture irradiée et d'une culture non irradiée. Le taux de multiplication en début de culture est fortement diminué après une irradiation fractionnée de 100 krad.

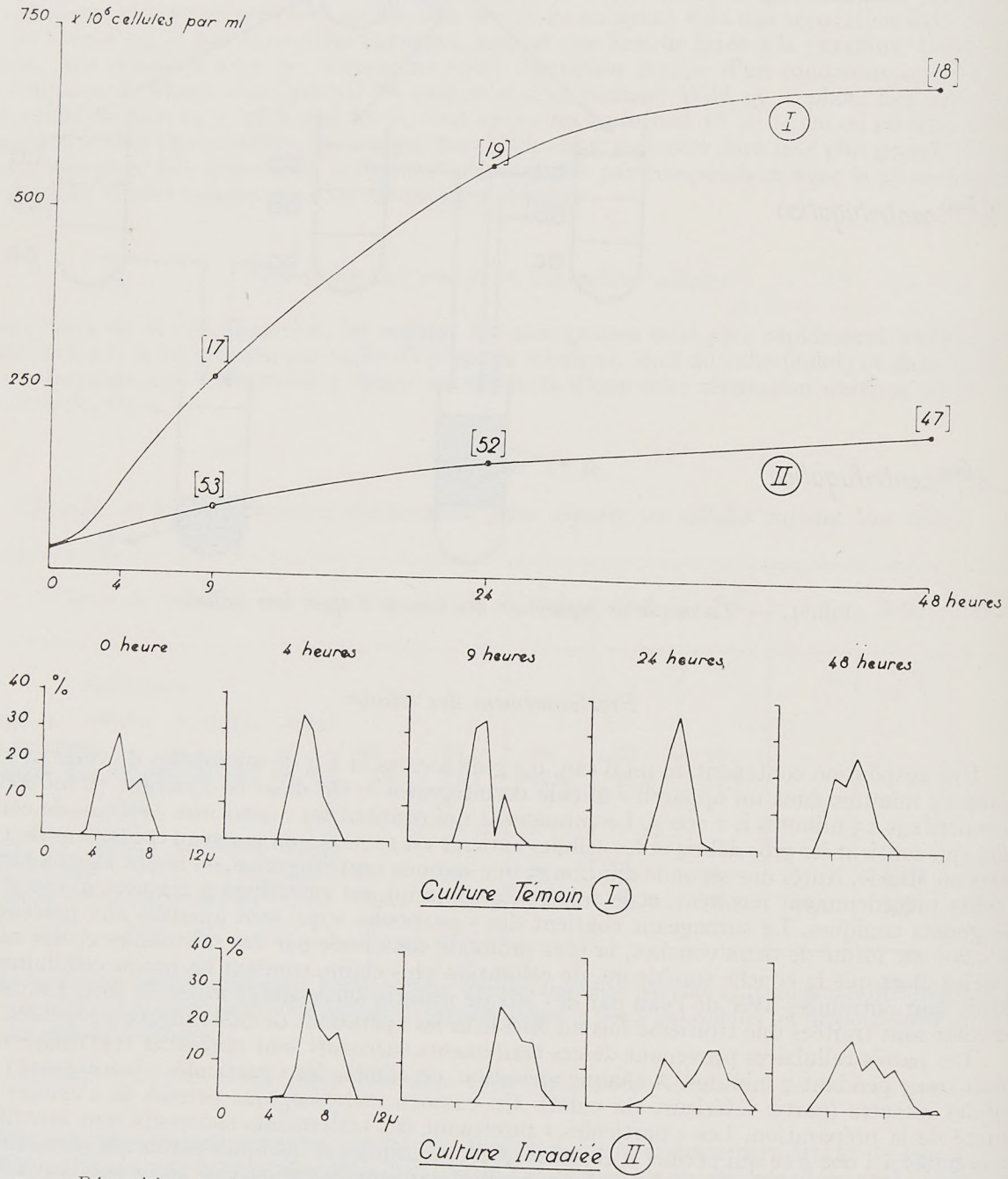


FIG. 2. — *Répartition des levures suivant la taille dans une culture irradiée et une culture non irradiée* *S. cerevisiae* CC 53-1, milieu malt WICKERHAM. Les chiffres entre [ ] représentent le poids moyen d'une cellule × 10^{-12} g

On détermine sur des photographies la taille des cellules et on établit les histogrammes de ces mesures tels qu'ils sont représentés sur la figure 2. Après 4 heures de croissance, il apparaît déjà dans la culture irradiée une proportion importante de cellules plus grosses que la normale. La proportion des cellules géantes dans la culture irradiée est encore plus grande après 24 heures. Comme l'inhibition du bourgeonnement n'est pas totale, on obtient après 24 heures et 48 heures des populations mixtes formées de grosses cellules et de cellules plus petites provenant de divisions cellulaires normales.

2. *Composition des cellules suivant la taille*

La technique de séparation des cellules que nous avons utilisée est très imparfaite mais suffit cependant à apporter une réponse à la question posée. Pour savoir si les grosses et les petites cellules ont la même composition en stérols, il suffit, en effet, d'obtenir des suspensions de levures dont la différence de poids moyen soit plus grande que les erreurs de reproductibilité que l'on peut effectuer sur le dosage de l'ergostérol.

TABLEAU 2

Composition des cellules de tailles différentes

	Culture non irradiée			Culture irradiée		
	Petites cellules	Grosses cellules	Augmentation (%)	Petites cellules	Grosses cellules	Augmentation (%)
Poids sec moyen d'une cellule $\times 10^{-12}$ g	25	34	36	54	68	26
Ergostérol en % du poids sec.	2,7	2,7	0	5,0	5,1	2
Azote total en % du poids sec.	5,5	5,7	3	5,5	5,6	2
ARN en % du poids sec :						
méthode 1	6,1	5,2		—	5,3	
méthode 2	6,0	5,4		5,7	5,6	

Culture de 48 heures dans un milieu mélasse 10 p. 100, peptone 1 p. 100. Irradiation fractionnée 5 × 20 krad. ARN, méthode 1 : dosage colorimétrique du ribose après extraction selon SCHNEIDER (1957) ; méthode 2 : dosage spectrophotométrique des bases dans l'acide perchlorique.

Le tableau 2 indique les résultats que nous avons obtenus en séparant ainsi des suspensions enrichies en grosses cellules ou en petites cellules. Il est évident que la séparation en deux fractions désignées par « petites » et « grosses cellules » ne représente pas la culture dans son intégralité car beaucoup de cellules ont été éliminées au cours des opérations d'enrichissement. On a traité de la même façon des levures provenant d'une culture normale et des levures provenant d'une culture irradiée. Dans le cas de culture non irradiée, la technique utilisée a permis d'obtenir deux fractions contenant des cellules dont le poids moyen diffère de 36 p. 100 ; de même dans le cas d'une culture irradiée, le poids moyen des cellules diffère de 26 p. 100.

Cependant, la teneur en stérols entre « grosses cellules » et « petites cellules » ne varie pas plus de 2 p. 100. La teneur en azote total ne paraît pas être différente suivant la taille des cellules. Toutefois il semble que la teneur en acide ribonucléique soit légèrement supérieure chez les cellules de petite taille ; ceci est dû vraisemblablement à ce que ces cellules ont un métabolisme protéique plus important car elles se trouvent dans une phase de multiplication active.

3. *Répartition des stérols à l'intérieur des cellules*

La technique décrite a permis de séparer le contenu cellulaire en trois fractions.

La fraction contenant les parois cellulaires a été reconnue indemne de cellules entières et les lavages répétés l'ont privée des unités subcellulaires. Les dosages de stérols faits sur cette fraction portent donc sur des structures bien isolées. Ils ont montré que les parois ne sont pas particulièrement riches en stérols bien qu'en contenant.

Les parties solubles de l'homogénat et les parties difficilement sédimentables (1 heure à 30 000 *g*) contiennent peu de stérols. Elles sont principalement constituées par les protéines en solution et des débris fins provenant du traitement mécanique des cellules. Il semble cependant que l'irradiation enrichisse cette fraction en stérols. Comme la récupération des ribosomes est plus difficile dans les cellules irradiées, on peut se demander si ce n'est pas la raison de cette différence.

TABLEAU 3

Répartition de l'ergostérol dans les cellules de levures

	Culture non irradiée				Culture irradiée			
	Cellules entières	Parois	Particules	Fraction soluble	Cellules entières	Parois	Particules	Fraction soluble
Ergostérol en p. 100 du poids sec	3,4	1,5	11,9	0,3	4,3	2,2	16,5	3,6
Azote total en p. 100 du poids sec	4,8	0,3	1,9	8,1	5,2	0,9	2,2	10,3

La fraction désignée sous le nom de « particules » comprend tous les éléments intracellulaires facilement sédimentables. Il s'agit surtout des noyaux, des mitochondries et des inclusions de réserves comme le glycogène et la volutine. Cette fraction ne contient pas les globules lipidiques qui s'accumulent à la surface du liquide pendant la centrifugation et qui sont éliminés par le traitement. Ces particules ainsi séparées sont très riches en stérols puisqu'elles peuvent en contenir jusqu'à 16 p. 100 du poids sec.

Les résultats du tableau 3 permettent de comparer la composition des fractions « parois », « particules » et « fraction soluble » préparées à partir de cultures irradiées et non irradiées. L'enrichissement en stérols, provoqué par l'irradiation, résulte principalement d'une teneur plus forte dans les particules. La chromatographie en couche

mince a permis de constater que l'ergostérol existant dans les parois est presque entièrement estérifié alors que celui qui est dans les particules est réparti entre la forme libre et la forme estérifiée.

DISCUSSION

Les cellules géantes produites par l'irradiation des levures pendant leur culture ne diffèrent des cellules plus petites ni par leur composition en azote, ni par leur teneur en stérols. La répartition des stérols à l'intérieur de la cellule est la même quelle que soit leur taille.

Les stérols qui s'accumulent en quantité plus importante dans les cellules provenant de cultures irradiées ne sont donc pas le fait de cellules particulières, riches en stérols. L'enrichissement est le même quelle que soit la façon dont les cellules réagissent à l'irradiation. Les cellules géantes, c'est-à-dire celles dont la division est bloquée, contiennent la même quantité de stérols que les cellules de taille plus petite qui ont continué à se diviser.

Cette expérimentation a été l'occasion de préciser la localisation des stérols dans la cellule de levure. L'existence de sites d'ergostérol sur la paroi, susceptible de se lier à la digitonine et aux antibiotiques à structure polyène, avait été démontrée par Lampen et *al.* (1962). Les cellules utilisées par cet auteur provenaient de cultures en phase exponentielle et elles étaient 10 fois moins riches en stérols que celles qui ont servi à nos essais. Dans ces conditions la plus grande partie des stérols se trouvait liée aux débris de parois et de membranes qui étaient sédimentées par une centrifugation de 20 minutes à 4 000 *g*.

Les cellules que nous avons utilisées étaient beaucoup plus riches en ergostérol et, dans ce cas, nos résultats indiquent que la plus grande partie de l'ergostérol se trouve associée aux fractions qui contiennent mitochondries, noyaux et granules de réserve. Il n'est pas possible que ce soient les fragments de parois résultant du traitement mécanique sévère qui enrichissent considérablement cette fraction en stérols, car nous avons vérifié que les parois sont, par elles-mêmes, peu riches en stérols. Il est donc vraisemblable d'admettre que les stérols qui s'accumulent en excès dans les cellules ne sont pas situés sur les parois mais associés à des particules qui se trouvent à l'intérieur de la cellule. Tsuda et Tatum (1961) ont d'ailleurs signalé dans les cellules de *Neurospora crassa* la présence d'inclusions cristallines d'ergostérol réparties au hasard dans le cytoplasme. Le fait que les stérols de la paroi sont presque intégralement estérifiés les différencie encore des stérols des particules qui ne sont que partiellement estérifiés.

Reçu pour publication en octobre 1966.

SUMMARY

REPARTITION OF ERGOSTEROL IN THE CELLS OF « S. CEREVISIAE » OBTAINED FROM IRRADIATED CULTURES

The authors have investigated whether the increase of sterol observed in yeast cultures irradiated during their development would not be produced by giant cells specially rich in this compound. To test this hypothesis the sterol content has been compared in two yeast populations coming from

the same culture, where the big and the little cells are in different proportions. Such enrichment in cells of different sizes is obtained by differential centrifugations. The sterol content is the same in this two populations although the mean weights of the cells are different by 30 p. 100.

For the most part the ergosterol is located in the particles spun down between 1 000 and 30 000 *g*. Such particles contain 11 p. 100 to 16 p. 100 of ergosterol in free and esterified form. The cell wall contains also a little quantity of ergosterol which is to a great extend esterified.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

DUPUY P., MAUGENET J., MORFAUX J. N., 1966. Accroissement de la teneur en stérols dans les levures irradiées au cours de leur culture. *Ann. Technol. agric.*, **15**, (3).

LAMPEN J. O., ARNOW P. M., BOROWSKA Z., LANSKIN A. I., 1962. Location and role of sterol at nystatin-binding sites. *J. Bacteriol.*, **84**, 1152-1160.

MAUGENET J., MORFAUX J. N., 1965. Séparation, identification, évaluation quantitative de l'ergostérol et de ses précurseurs dans la levure. *Ann. Technol. agric.*, **1**, 23-33.

MEISSEL M. N., REMEZOVA T. S., BIRYUZOVA V. I., GALTZOVA R. D., MEDVEDEVA G. A., POMOTCHNIKOVA N. A., SELIVERSTOVA L. A., POGLAZOVA M. N., NOVICHKOVA A. T., VOLKOVA T. M., 1964. Cytophysiological and biochemical investigations of the microorganisms during their restoration after radiation injury. *Izvest. Akad. Nauk SSSR, ser. Biol.*, 827-851.

SCHNEIDER W. C., 1957. Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis. *Methods in Enzymology*, vol. 3, 680-684, Academic Press, New York.

TSUDA S., TATUM E. L., 1961. Intracellular crystalline ergosterol in *Neurospora*. *J. biophys. biochem. Cytol.*, **11**, 171-177.

Ann. Technol. agric., 1966, **15** (4), 335-347.

VALEUR TECHNOLOGIQUE DU DOSAGE DES TANINS DANS LES JUS DE POMME

B. MONTIES et P. JACQUIN

Station de Technologie végétale, 78 - Versailles ;
Station de Recherches cidricoles,
Centre de Recherches agronomiques de l'Ouest, 35 - Rennes

SOMMAIRE

Les tanins des jus de pomme peuvent être précipités par la cinchonine. La variation d'indice de permanganate consécutive à ce traitement permet seulement le dosage des polyphénols tanins; seule la pesée du précipité permet le dosage des tanins totaux. Lors de l'aération des jus, on constate que la teneur en polyphénols tanins diminue davantage que celle des polyphenols non tanins alors que la teneur en tanins totaux augmente.

INTRODUCTION

En technologie, on désigne par tanins un groupe de substances végétales contenant des fonctions polyphénoliques, solubles dans l'eau et capables de se combiner avec les protéines pour donner des composés peu solubles. Les tanins réagissent avec le collagène de la peau pour former les cuirs ; de la même façon, ils se combinent avec les extraits solubles de collagène, les gélatines, qu'ils précipitent de leurs sols. Cette faculté est mise à profit lors de la clarification des jus par collage, elle a cependant une portée technologique beaucoup plus générale. Les tanins en effet se combinent avec d'autres systèmes protéiques importants ; ils limitent, par exemple, l'action des enzymes pectolytiques en les précipitant. Ils peuvent, au cours de ces collages, réagir non seulement avec d'autres systèmes colloïdaux comme les polysaccharides mais encore complexer spécifiquement certains ions. Ils sont aussi adsorbés par les parois cellulaires des microorganismes (CHEVALIER *et al.*, 1961). Enfin, les tanins insolubilisent les mucoprotéines salivaires : la sensation d'astringence en résulterait et, alors même que la sensation d'astringence n'est pas perçue lors de la dégustation d'un jus de pomme, la présence de ces substances est indispensable pour donner du « corps » au jus.

Les tanins sont aussi précipités de leur solution aqueuse par addition de bases quinoléiques et d'alcaloïdes. Cette propriété est utilisée pour caractériser les tanins dans les extraits végétaux et pour les en extraire. On peut rendre quantitative cette réaction de précipitation. Quelques auteurs ont mis à profit cette propriété

pour doser les tanins présents dans les écorces (HOPPER, 1925), le cacao (JENSEN, 1928 ; DUTHIE, 1938), le thé (NORMAN et HUGUES, 1936) et la bière (CHAPMAN, 1907 ; CHAPON et CHEMARDIN, 1963). Il semble que, dans les cidres, DE BOUTEVILLE et HAUCHECORNE (1875) aient été les premiers à utiliser un alcaloïde (cinchonine) pour précipiter les tanins ; ces auteurs dosaient directement les tanins par pesée du précipité. SPIERS (1914), indépendamment de ces travaux, a aussi recommandé l'utilisation d'alcaloïdes afin de précipiter spécifiquement les tanins du cidre ; il a dosé les tanins par différence entre les indices de permaganate du cidre avant et après précipitation. Enfin, BRUGIRARD et TAVERNIER (1952) ont systématiquement analysé les conditions de précipitation, ils ont proposé une méthode qui a été utilisée dans ce travail.

On a caractérisé les tanins par les trois méthodes suivantes :

pesée du précipité de « tanate de cinchonine »,
pouvoir réducteur de ce précipité mesuré par oxydation permanganique,
pouvoir réducteur des jus avant et après précipitation des tanins.

La pesée du précipité de tanate de cinchonine permet d'apprécier la totalité des tanoïdes appelés ici « tanins totaux ». L'indice de permanganate de ce précipité caractérise donc les « polyphénols tanins » appelés « tanins vrais » par BRUGIRARD et TAVERNIER (1952). La variation de l'indice de permanganate des jus, consécutive à la précipitation, mesure donc aussi la teneur en polyphénols tanins, elle représente, aux erreurs d'expérience près, la différence entre les « polyphénols totaux » et les polyphénols non précipitables par la cinchonine ou « polyphénols non tanins ».

Ces trois dosages permettent de préciser la teneur des jus de pomme à cidre en composés phénoliques et en tanoïdes, ainsi que leur évolution après défécation ou oxydation.

TECHNIQUES UTILISÉES

1. *Préparation des jus*

Seize échantillons de jus de pomme à cidre ont été obtenus par pression selon la technique d'extraction décrite et utilisée systématiquement par JACQUIN depuis 1952. Ces jus ont été pasteurisés (5 minutes à 65°) puis conservés 1 an à 4°C. Ils n'ont subi aucun autre traitement, ce sont donc des « moûts » ou « jus troubles » sortant de presse.

Afin de préciser l'influence de l'oxydation et de la défécation (voir discussion), deux échantillons supplémentaires (variétés *Damelot* et *Egyptia*) ont été extraits par essorage centrifuge au moyen d'une essoreuse ménagère. Les pommes ont été préalablement refroidies à 4°C. Les tranches de fruits sont râpées dans l'appareil ; la râpure est immédiatement projetée sur un cylindre tournant à grande vitesse. Ces jus n'ont pas été pasteurisés, ils ont été conservés trois mois à 4°C. Ces échantillons peuvent être considérés comme des « jus pulpeux » : jus dans lesquels on introduit une partie de la pulpe finement divisée.

2. *Oxydation des jus*

On a choisi deux variétés de pommes à cidre dont les jus présentent des caractères extrêmes de brunissement enzymatique : *Damelot* brunit intensément, *Egyptia* brunit peu, toutes deux ont un indice de permanganate total élevé. 500 ml de jus ont été extraits par essorage centrifuge; ils ont été placés dans des fioles à plasma hermétiquement bouchées et conservées à 4°C. Trois mois après, les dépôts formés ont été remis en suspension par agitation ; 250 ml ont été transvasés dans un ballon en évitant le plus possible l'aération. Les 250 ml restants furent « oxydés » à la température ambiante par agitation sous atmosphère d'oxygène. Les quatre échantillons troubles ont été conservés 4 jours à 4°C pendant lesquels ils ont défequé.

3. *Dosages*

Les jus ont été préalablement clarifiés par centrifugation (30 minutes, 10 000 *g*, 4°C).

Les tanins ont été précipités de leur solution (100 ml de jus) par la cinchonine sous forme de sulfate acide dans les conditions proposées par BRUGIRARD et TAVERNIER (1952) : pH neutre, présence de bicarbonate de sodium, durée de précipitation limitée à 20 minutes. Le précipité lavé sur filtre avec une solution à 10 p. 100 de sulfate de sodium est séché à 70° et pesé.

Le pouvoir réducteur a été mesuré sur une fraction aliquote du précipité et sur 10 ml de jus par oxydation permanganique en milieu acide, aqueux et dilué ; le titrage étant fait en présence de carmin d'indigo. Le réactif était apporté de façon continue (0,05 cm^3/sec) et mélangé rapidement et régulièrement par agitation mécanique.

4. *Mesure de viscosité*

On a comparé la viscosité des jus par la technique d'ascension capillaire sur bande de papier; pour cela on a mesuré la durée d'ascension sur 10 cm à 40°C et en atmosphère confinée (le papier étant en équilibre avec cette atmosphère). D'après MARTIN (1948), l'application de la loi de Poiseuille à l'écoulement capillaire d'un fluide visqueux conduit à l'expression (1) :

$$h^2 = \frac{\sigma \cdot r}{2 \cdot \eta} \cdot \cos \delta \cdot t \qquad (1)$$

h = hauteur d'ascension (cm)
σ = tension superficielle (dyne. cm^{-1})
η = viscosité (poise)
r = rayon capillaire équivalent (cm)
δ = angle de raccordement (grade)
t = temps d'ascension (sec).

Lorsque le papier est en équilibre avec l'atmosphère, sa mouillabilité est uniforme, donc δ est constant sur toute la hauteur de la bande. Comme de plus les rayons des capillaires du papier sont toujours très petits, cet angle δ de raccordement est voisin de zéro (loi de Jurin), donc en première approximation cos $\delta = 1$. Dans ces conditions, on déduit de (1) la formule (2) :

$$\eta = \frac{\sigma \cdot r}{2 \cdot h^2} \cdot t = k \cdot t \qquad (2)$$

Dans des conditions définies, la durée d'ascension capillaire est directement proportionnelle à la viscosité du liquide ; la formule (2) a été utilisée ici pour mesurer la viscosité relative des jus par rapport à l'eau.

RÉSULTATS

1. *Précision des dosages*

Le tableau 1 présente les erreurs absolues et relatives sur le titrage du carmin d'indigo, des polyphénols totaux, des polyphénols non tanins et du dosage direct des polyphénols tanins. Ces valeurs ont été calculées, dans chaque cas, sur 8 dosages conduits indépendamment.

TABLEAU I

Précision des dosages volumétriques

Titrage	Carmin d'indigo	Polyphénols totaux	Polyphénols non tanins	Polyphénols tanins
Erreur absolue à 95 % (en ml) .	0,2	0,2	0,2	0,4
Erreur relative (en %).....	2	2	5	10

2. *Teneur des jus en polyphénols*

Le tableau 2 présente les teneurs de 16 variétés de pommes à cidre en polyphénols totaux et polyphénols non tanins. Chaque mesure a été répétée autant de fois qu'il fallait (6 au maximum) pour obtenir trois résultats ne différant que de 0,05 cm^3 ; la valeur rapportée est la moyenne de ces trois mesures.

TABLEAU 2

Teneurs en polyphénols de jus de diverses variétés

Variété (origine)	Polyphénols totaux (méq./l)	Polyphénols non tanins (méq./l)	Polyphénols non tanins (% total)
Domaines (Calvados)	74,7	45,0	60,1
Dous Moen (Calvados)	70,9	43,6	61,5
Longbois (Mayenne)	63,0	44,8	71,2
Dous Moen (Manche)	62,8	38,1	60,7
Noël des Champs (Mayenne)	60,6	37,5	61,8
Petit Damelot (Mayenne)	54,5	26,6	48,8
Duc de Bade (Seine-Maritime)	54,3	22,3	41,1
Bedan (Mayenne)	53,4	31,0	58,1
Brohain aigre (Morbihan)	52,9	26,7	50,5
Argile grise (Manche)	50,6	30,9	60,0
Ameret blanc (Orne)	49,5	28,3	57,1
Doux de la Clôture (Morbihan)	47,0	25,8	54,9
Keraskaouet (Morbihan)	45,9	23,2	50,6
Fréquin ou *Petit rouge précoce*	44,0	24,8	50,6
Argile rouge (Manche)	42,3	29,6	70,0
Robert de Rennes (Mayenne)	38,0	21,1	52,1
Fréquin tardif (Mayenne)	33,2	16,2	50,8

3. *Défécation*

Le tableau 3 présente la variation de teneurs en polyphénols totaux trouvée après un an de stockage à 4°C au cours duquel ces jus troubles ont déféqué. Les teneurs sont exprimées en grammes de gallotanin /litre afin de simplifier la comparaison avec les « Études Technologiques » de JACQUIN (1952 à 1966).

4. *Clarification et viscosité*

Quelques observations ont été faites sur les jus dont on a comparé la viscosité et la manière dont se dépose le complexe tanin-alcaloïde. Quatre échantillons (*Brohain aigre, Frequin tardif, Duc de Bade, Keraskaouet*) ont été choisis parce qu'ils présentaient des caractéristiques extrêmes de défécation. En bouteilles, le jus des deux premiers était limpide, le second présentait un léger dépôt ; les deux derniers étaient uniformément troubles. Lors de la formation du complexe tanin-cinchonine on a constaté, 20 minutes après le début de la précipitation, que les deux derniers jus étaient uniformément troubles avec cependant une légère tendance à former des lies en surface. Le premier jus était trouble sur un lourd dépôt ; le second était clair entre

deux lies. Le tableau 4 résume ces observations. La viscosité des jus a été mesurée par rapport à l'eau, elle est exprimée en viscosité relative ; la durée absolue d'ascension des deux teneurs étant respectivement de 9 et 9,5 minutes pour 10 cm de papier Whatman n° 1 à 40°C.

TABLEAU 3

Influence de la défécation sur la teneur en polyphénols

Variété	Polyphénols totaux en g/l de gallotanin		Diminution relative (%)
	avant défécation	après défécation	
Domaines	3,12	3,11	0,3
Dous Moen	3,52	2,95	16,2
Longbois	3,04	2,63	13,1
Dous Moen	2,72	2,63	3,0
Noël des Champs	2,96	2,53	15,5
Petit Damelot	3,32	2,26	1,5
Duc de Bade	2,88	2,26	21,5
Bedan	2,72	2,23	18,4
Brohain aigre	2,24	2,20	1,3
Argile grise	2,16	2,11	2,3
Ameret blanc	2,48	2,06	16,9
Doux de la Clôture	2,32	1,96	15,5
Keraskaouet	2,40	1,91	20,4
Fréquin ou *Petit rouge précoce*	2,16	1,83	15,3
Argile rouge	1,84	1,76	1,4
Robert de Rennes	1,92	1,58	17,7
Fréquin tardif	1,44	1,39	0,3

TABLEAU 4

Viscosité des jus et clarification

	Brohain aigre	*Fréquin tardif*	*Duc de Bade*	*Keraskaouet*
Type de défécation	jus clair pas de dépôt	jus clair faible dépôt	jus trouble	jus trouble
Viscosité relative (eau = 1)	4,3	2	2,9	2,6
Précipitation du tanate de cinchonine	jus trouble sur dépôt	jus clair sous chapeau	uniformément trouble	uniformément trouble

5. *Oxydation*

Les tableaux 5, 6 et 7 présentent les résultats des expériences d'oxydation et de cuvage des jus pulpeux. Quelques observations qualitatives ont été faites sur la couleur et la manière de déféquer de ces jus.

A la sortie de l'essoreuse-centrifuge les jus de *Damelot* et d'*Egyptia* étaient de

couleur jaune pâle. Leurs caractéristiques d'acidité (pH 3,5 ; acidité de titration 20 méq. /l) très voisines. Après 2 heures d'aération intense par agitation en atmosphère d'oxygène, on a constaté que le jus de *Damelot* brunissait fortement jusqu'à devenir brun-rouge alors que la couleur du jus *Egyptia* était à peine modifiée et ne prenait qu'une légère nuance orangée. Les jus oxydés et les jus témoins correspondants n'ont pas déféqué de la même manière après 3 jours de stockage à 4°C. Dans les quatre cas, on a obtenu des jus clairs. Les dépôts pulpeux étaient beaucoup plus importants dans les jus oxydés que dans les jus témoins ; ils sont aussi plus colorés. Dans le jus de Damelot oxydé, le dépôt était uniformément brun-rouge alors que dans le jus d'Égyptia seul le léger chapeau était brun-rouge, les lies étant blanc crème.

TABLEAU 5

Influence de l'oxydation sur les teneurs en polyphénols

	Damelot			*Egyptia*		
	Témoin	Oxydé	Variation relative	Témoin	Oxydé	Variation relative
Polyphénols totaux (méq./l) ...	91,6	42,1	— 54,0	89,9	71,8	— 20,1
Polyphénols non tanins (méq./l)	47,3	29,6	— 37,5	64,8	56,2	— 13,3
Polyphénols tanins (méq./l)	44,3	12,5	— 71,7	25,1	15,6	— 37,9
$\left(\frac{\text{Polyphénols tanins}}{\text{Polyphénols totaux}}\right)$ p. 100 ...	48,4	29,6	—	27,9	21,7	—
Couleur des jus.....	jaune pâle	brun-rouge		jaune pâle	jaune orange	

Les jus sont séparés des lies par centrifugation, le tableau 5 présente les variations absolues et relatives de l'indice de permanganate.

Le tableau 6 permet de constater l'influence de l'oxydation et de la défécation des jus pulpeux. Les poids de tanate de cinchonine ont été rapportés seulement

TABLEAU 6

Influence de l'oxydation sur les teneurs en tanins

Tanins	*Damelot*		*Egyptia*	
	Témoin	oxydé	Témoin	oxydé
Polyphénols tanins (méq./l)	44,3	12,5	25,1	15,6
(Vr %)		(— 71,7)		(— 37,9)
Précipité à la cinchonine (g/l)	5,8	9,5	4,1	5,4
(Vr %)		(+ 63,7)		(+ 31,7)

Vr % = variation relative.

pour fournir des éléments de discussion sur la précision de la méthode gravimétrique de dosage utilisée ici. Il n'est pas possible actuellement de préciser le rapport existant entre les masses de tanate et de tanin précipités.

6. *Dégustation*

Le tableau 7 présente les résultats de la dégustation de quatre jus de pommes à cidre. Ces quatre échantillons ont été choisis en fonction de leur composition chimique, les conditions de préparation (JACQUIN, 1952) et notamment celles d'oxydation étant très voisines. La dégustation a été faite par des dégustateurs avertis, elle a été répétée.

TABLEAU 7

Caractères organoleptiques et chimiques de quatres échantillons

	Fréquin tardif (1)	*Keraskaouet* (2)	*Brohain aigre* (3)	*Duc de Bade* (4)
Jugement	non astringent	astringent	astringent	très astringent
Densité	1,047	1,048	1,052	1,044
Sucres totaux (g/l)	102,6	110,6	108,26	92,0
Acidité de titration (méq./l)	17,9	27,9	113,8	107,9
pH	4,2	3,9	3,3	3,2
Viscosité relative	2	2,6	4,3	2,9
Polyphénols totaux (méq./l)	33,2	45,9	52,9	54,3
Polyphénols tanins (méq./l)	16,9	22,7	26,2	32,0

Le classement proposé a été invariablement le même ; par ordre d'astringence croissante les jus ont été rangés : $1 < 2 = 3 < 4$.

DISCUSSION

Les tanins sont définis comme un ensemble de substances précipitables sans considération de nature, de conformation ou de réactivité ; la nécessité de précipiter ces substances pour les caractériser conduit naturellement à les doser par gravimétrie.

Les trois principaux groupes de substances utilisées pour isoler les tanins de leurs solutions sont les ions de métaux lourds, les substances protéiques, les alcaloïdes. Il est possible de précipiter les tanins des cidres par addition de sels de plomb ou de zinc (BURROUGHS et WHITING, 1960). BRUGIRARD et TAVERNIER (1952) ont montré que la séparation n'est pas quantitative même lorsque l'on utilise l'acétate de zinc ammoniacal (NÈGRE, 1945). Les substances protéiques, au contraire, ne sont pas assez spécifiques ; leur affinité pour les tanins dépend à la fois des caractéristiques macromoléculaires du tanin et de la protéine utilisée (CHAPON, 1966). La spécificité de la gélatine, en particulier, dépend des conditions de milieu : elle précipiterait en

solution concentrée les seuls tanins (JONES, 1927) ; dans les cidres, cependant, elle ne permet pas de faire une distinction rigide entre les tanins vrais et les substances polyphénoliques non polymérisées (WILLIAMS, 1952). La caséine a été utilisée par SPIERS (1914), elle précipiterait spécifiquement les tanins même en présence de catéchine ; on ne l'a pourtant pas utilisée parce que, de l'avis de SPIERS lui-même, l'utilisation d'alcaloïdes est préférable.

Les alcaloïdes, contrairement aux systèmes multimoléculaires protéiques, sont des composés définis ; certains d'entre eux précipitent spécifiquement les tanins, même en présence de catéchine (HOOPER, 1925). En utilisant les alcaloïdes, on peut donc espérer obtenir des résultats au moins aussi spécifiques et surtout beaucoup plus reproductibles que ceux obtenus avec les agents de précipitation protéique. En 1929, FEAR a montré que la réaction de précipitation par les alcaloïdes est le fait d'une réaction chimique ; qu'il est préférable d'utiliser des solutions saturées en sel d'alcaloïde et que seulement certains groupes d'alcaloïdes(quinoléiques, indoliques) fournissent un précipité important. Il suffit d'ajuster le pH du milieu et d'ajouter un sel de base forte (CO_2 Na_3) pour précipiter tous les tanates d'alcaloïde (WARE et SMITH, 1933) ; comme ces conditions correspondent à celles réalisées lors de la précipitation des alcaloïdes cristallisables (CROMWELL, 1954), il semble que la réaction de précipitation du tanate soit en relation avec la formation d'alcaloïde-base insoluble dans l'eau. En 1952, BRUGIRARD et TAVERNIER sont parvenus, indépendamment de ces travaux, aux mêmes conclusions méthodologiques que WARE et SMITH (1933) ; ils ont montré que dans le cas particulier des cidres il était nécessaire de tenir compte de la durée de précipitation afin de séparer totalement les seuls tanins.

L'ensemble de ces raisons nous a conduits à utiliser la précipitation par la cinchonine pour séparer les tanins, pour les doser et pour mesurer leur pouvoir réducteur. Bien que HOOPER (1925) ait vérifié que le précipité formé par les tanins des écorces avec la cinchonine a une composition définie et que JENSEN (1928), puis DUTHIE (1938) aient confirmé et mis en pratique cette relation pour le dosage des tanins du cacao, nous n'avons pas utilisé cette relation pour doser les tanins des pommes. Il n'est pas démontré, en effet, que le précipité formé à partir du jus de pomme n'est pas un complexe contenant aussi des pectines et des protéines. Pour cette raison, nous avons seulement mesuré le poids du précipité avant et après aération de l'échantillon étudié et comparé la variation de son poids à celle de l'indice de permanganate.

1. *Interprétation des résultats*

La précision du dosage par le permanganate calculé sur des séries d'expériences menées indépendamment confirme les résultats de BRUGIRARD et TAVERNIER. Le dosage direct des polyphénols tanins manque de précision parce que le tanate de cinchonine est seulement dispersé dans le milieu de titrage et non totalement dissous, la turbidité du milieu de dosage gêne beaucoup la perception virage. On a donc dosé systématiquement les polyphénols tanins par différence ; le titrage direct et le titrage par différence donnent cependant, aux erreurs d'expérience près, des résultats comparables. Le carmin d'indigo, entre autres rôles, limite donc bien l'oxydation aux fonctions polyphénoliques ; il est oxydé avant les autres constituants du jus et surtout ici, avant la cinchonine, oxydable dans les conditions du dosage (CAVENTOU et WILM, 1869).

On constate, d'après le tableau 2, que les polyphénols non tanins représentent près de 57 p. 100 des polyphénols totaux en moyenne. Ce résultat est quelque peu inattendu dans ces jus réputés riches en tanin. Ces teneurs sont pourtant du même ordre, quoique légèrement inférieures en moyenne à celles trouvées par BRUGIRARD et TAVERNIER (1952) dans des cidres de variété pure. Il est assez normal de constater que des jus de pommes bruts soient relativement plus riches en tanin que des cidres qui ont pu être appauvris par défécation et formations de lies après fermentation.

On constate, d'après le tableau 3, que le stockage prolongé des moûts troubles à basse température (1 an, 4°C) conduit le plus souvent à une diminution importante des polyphénols totaux : pour 10 échantillons sur 17, la diminution est comprise entre 14 et 21 p. 100 alors que dans les 7 autres elle est inférieure à 3 p. 100. Il est peu vraisemblable que ces variations et ces différences soient le fait d'oxydations consécutives au stockage prolongé : ces jus ont été conditionnés de façon tout à fait semblable. Il est beaucoup plus vraisemblable que ces diminutions de l'indice de permanganate global traduisent la précipitation des polyphénols lors de la défécation. Cette réaction d'insolubilisation des matières phénoliques est tout à fait comparable à celle qui aboutit à la précipitation des solutions de polysaccharides (gomme adragante) par les tanins (STOCKS et GREENWOOD, 1925) ; elle est d'ailleurs mise à profit lors du « cuvage des pulpes fraîches » utilisé traditionnellement (WARCOLLIER, 1920 ; LUCKWILL et POLLARD, 1963) pour diminuer la teneur des jus en tanin.

Le tableau 4 met en comparaison la viscosité relative de quatre échantillons, leur manière de déféquer et la façon de précipiter du tanate de cinchonine. Il permet de constater qu'il existe une relation entre la viscosité du jus et la façon de précipiter du tanate de cinchonine alors qu'il n'existe pas de relation immédiate entre la viscosité et l'aptitude à la défécation. Il est assez peu surprenant de constater ce résultat parce que la défécation n'est pas une simple réaction de précipitation et qu'il n'existe pas de relation bien définie entre la viscosité des moûts et leur teneur en pectine (JACQUIN et TAVERNIER, 1956).

Les deux échantillons de *Damelot* et *Egyptia* ont été extraits par centrifugation : on a choisi cette technique parce qu'elle permet d'obtenir des jus qui sont à la fois moins oxydés et moins riches en pectine que les jus de presse correspondants (DUDEN, 1964 ; GUINOT et MENORET, 1965). Ces jus permettent d'étudier plus commodément les effets d'aération parce que, d'une part, ils sont peu oxydés et que, d'autre part, la précipitation des tannis par défécation est réduite du fait de la teneur moindre en pectine. Il est nécessaire de travailler sur des jus pulpeux parce que les polyphénoloxydases sont surtout liées aux structures insolubles dispersées dans le jus (HAREL et *al.*, 1965).

On constate, d'après le tableau 5, que la teneur des jus en polyphénols totaux décroît considérablement après aération ; les variations relatives sont de 20 et 54 p. 100. GUINOT et MENORET (1965) comparant des jus de presse (jus oxydés) à des jus d'essorage (très peu oxydés) ont rapporté des différences de teneurs en substances polyphénoliques tout à fait voisines. Ces auteurs ont utilisé la méthode Folin-Denis qui fait appel à l'oxydation de certaines fonctions phénoliques par un complexe tungsto-molybdique (SINGLETON et ROSSI, 1965). La variation rapportée mesure donc la variation de pouvoir réducteur de ces substances ; il est donc normal de constater que l'oxydation permanganique fournit des résultats comparables. L'importance relative des polyphénols tanins dépend à la fois (tabl. 5) de la nature du jus

et de son degré d'oxydation ; l'indice de permanganate ne permet donc que le dosage du pouvoir réducteur des tanins.

Un fait nouveau ressort de la comparaison des variations relatives des teneurs en polyphénols (tabl. 5) : les polyphénols tanins sont plus oxydés que les polyphénols non tanins. Ce fait est surprenant, il ne peut être expliqué par une oxydation directe des tanins par un système enzymatique. Il est établi, en effet, que les tanins inhibent de façon générale les enzymes en solution (POLLARD et *al.*, 1958 ; WILLIAMS, 1963) par un mécanisme non compétitif (GOLDSTEIN et SWAIN, 1965 ; GADAL et BOUDET, 1965). Un tel processus équivaut à un collage. L'oxydation directe des tanins serait donc limitée à la fois par combinaison du substrat et des produits de réaction qui précipitent l'enzyme. L'oxydation préférentielle des tanins serait donc le fait d'une oxydation induite par des transporteurs : les polyphénols non tanins oxydables par la polyphénoloxydase joueraient ce rôle de transporteur. Un tel processus a été décrit *in vitro* par ROBERTS (1957) sur les quercétosides du thé et par NEUMANN et *al.* (1960) sur l'acide ascorbique. Le processus d'oxydation induite par la polyphénoloxydase paraît suffisant pour expliquer l'oxydation préférentielle des tanins ; les non tanins seraient oxydés de façon beaucoup plus limitée parce qu'ils ont surtout un rôle de transporteur (acide chlorogénique) ou ne sont pas oxydés pour des raisons stériques (quercétosides).

Le tableau 6 montre qu'une diminution de l'indice de permanganate au cours d'une opération technologique n'est pas suffisante pour que l'on puisse conclure à une diminution de la teneur en tanin. Alors que l'indice de permanganate (polyphénols-tanins) diminue, le poids du précipité de tanate de cinchonine (tanins totaux) augmente. Une telle augmentation a déjà été constatée par DUTHIE (1938) lors de la fermentation oxydative du cacao ; le phénomène n'avait pas été interprété. Il est tout à fait vraisemblable que cette augmentation résulte de la polymérisation oxydative des non tanins qui se combinent entre eux ou viennent se condenser sur les tanins tout en les oxydant par couplage oxydatif. Ce processus conduit à la synthèse de tanins dont le pouvoir réducteur est très faible : on constate en particulier, que les tanins des vinaigres de cidre ont un pouvoir réducteur pratiquement nul alors que le précipité qu'ils forment avec la cinchonine est extrêmement important. Le phénomène de formation de tanins condensés par oxydation est d'ailleurs tout à fait général ; il a été constaté par CHAPON et *al.* (1961, 1963, 1966) dans des bières, il a une importance capitale dans l'élaboration des thés et du cacao (ROELOFSEN, 1958 ; ROBERTS, 1962). Il est aussi remarquable que ce phénomène soit à l'origine de trouble dans les bières (CHAPON, 1963) autant que dans le jus de pomme (MONTIES et BARRET, 1965). Nous avons observé la présence de trouble au froid réversible dans certains échantillons de jus du tableau 2.

Les variations importantes du poids de précipité rapportées au tableau 6 résultent du fait que l'oxydation a été faite sur jus pulpeux et non en présence de pulpes qui insolubilisent les tanins formés (« cuvage »). Le dosage a été fait sur 100 ml de jus, les teneurs rapportées au litre de jus sont comparables à celles de DE BOUTEVILLE et HAUCHECORNE (1875). En 1963, CHAPON et CHEMARDIN ont montré que la teneur en tanoïdes précipitables d'une solution pure de tanin de l'orge double sensiblement après 8 jours d'aération ; cet effet d'oxydation entraîne l'augmentation du poids de tanate de cinchonine. NORMAN et HUGUES (1936) ont constaté que le séchage et la fermentation des feuilles de thé s'accompagne d'une forte diminution

de l'indice de permanganate alors que le poids du précipité de tanate est beaucoup moins affecté ; ce dernier résultat s'explique par l'insolubilité et l'adsorption des tanins sur les parois cellulaires : les auteurs dosaient en effet les tanins dans l'infusion de thé. Il est vraisemblable aussi que cette insolubilisation dépend de la nature des tanins : NORMAN et HUGUES (1936) ont observé que « les tanins du cacao pouvaient être soumis à un sévère traitement d'oxydation sans que cependant le poids de tanins précipitables par la cinchonine ne diminue de façon appréciable ». DUTHIE, en 1938, a même constaté une augmentation. L'oxydation des jus pulpeux a donc un effet tout à fait différent du cuvage.

Les phénomènes de polymérisation oxydative entraînent aussi la formation de produits colorés. Les tanins ne semblent avoir un rôle de matière colorante qu'avant l'oxydation des jus; les échantillons d'*Egyptia* et surtout de *Damelot* non oxydés et privés de tanin par traitement à la cinchonine sont presque incolores ; par contre, la « couleur surimposée » des jus oxydés provient en grande partie de non tanins. La structure de tous ces produits d'oxydation est encore hypothétique. La présence de fonctions orthoquinoniques, extrêmement réactives (ZAPROMETOV, 1964), est peu vraisemblable parce que ces fonctions donnent facilement lieu à condensation avec les autres polyphénols ou les acides aminés notamment. Des composés de type « tearubigines » (ROBERTS, 1962 ; ZAPROMETOV, 1964) sont donc tout à fait possibles. La présence de quercétine ou de quercétoside dans ces tanoïdes n'est pas exclue : il pourrait s'agir de composés covalents formés par couplage oxydatif ou simplement inclus dans le réseau tridimensionnel des tanins, comme ce serait le cas pour les anthocyanes dans les tanins des vins rouges (SOMMERS, 1966). Il semble que les acides chlorogéniques et la quercétine soient des constituants importants de certains troubles au froid, dans les jus de pomme; l'existence de combinaison semblable a été rapportée dans les extraits aqueux et oxydés de feuilles de tabac (WRIGHT et al, 1964).

Le tableau 7 présente la composition chimique des jus soumis à dégustation. La méthode de classement simple a été utilisée ici parce qu'elle permet une discrimination rapide entre des échantillons différant par plus d'un caractère. On constate sur ce tableau, que l'indice de polyphénols tanins représente bien l'astringence. On vérifie aussi l'observation faite depuis longtemps par JACQUIN (1952 à 1966) de l'exaltation de l'astringence par l'acidité. De plus la comparaison des variétés *Keraskouet* (2), *Brohain Aigre* (3) permet de constater l'influence de la viscosité sur l'astringence, influence qui se traduit par une atténuation importante de l'astringence. Dans le cas de *Brohain Aigre* cette atténuation compense l'exaltation de l'astringence par l'acidité.

CONCLUSION

Ce travail confirme les observations de SPIERS (1914) et de BRUGIRARD et TAVERNIER (1952) sur la teneur des produits dérivés de la pomme en tanin et sur l'influence du cuvage. Il complète ces observations en montrant l'importance considérable des processus d'oxydation sur les teneurs de ces produits en polyphénols non tanins, en polyphénols tanins et en tanins vrais ou précipitables.

Les indices de polyphénols sont utiles pour apprécier le degré d'oxydation des jus ; ils reflètent donc les traitements subis par ces produits. Ils ne permettent cependant d'apprécier qu'une des qualités des tanins, leur pouvoir réducteur. Il est donc indispensable de précipiter les tanins pour les doser, le dosage gravimétrique reste encore la meilleure méthode pour cela ; il reste à démontrer que le précipité obtenu a une composition définie.

Un fait est donc indéniablement acquis : l'indice de permanganate permet seulement la mesure du pouvoir réducteur des tanins. Ainsi se confirment l'intérêt des recherches théoriques sur le mécanisme de polymérisation oxydative des polyphénols ainsi que l'importance pratique générale de ce processus.

Reçu pour publication en juin 1966.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement M. FLECKINGER, directeur de recherches, I. N. R. A., Station Amélioration des Plantes, Versailles, qui a bien voulu nous procurer les échantillons des variétés *Egyptia* et *Damelot*.

SUMMARY

TECHNOLOGICAL VALUE OF THE DETERMINATION OF TANNINS IN APPLE JUICES

The tannins in apple juices may be precipitated by cinchonine. The variation of the permanganate equivalent following this process only allows to determine the tannin polyphenols ; the total tannins may only be determined by the weighing of the precipitate. As a result of the oxidation of juices, it may be noted that the « tannin-polyphenol » content decreases whereas that of « total-tannins » increases.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BOUTEVILLE L. de, HAUCHECORNE A., 1875. *Le cidre*. Deshays L., Éditeur. Rouen.

BRUGIRARD A., TAVERNIER J., 1952. Les matières tannoïdes des cidres et des poirés. *Ann. Technol. agric.*, **1**, 311-343.

BURROUGHS L. F., WHITHING G. C., 1960. The optical rotation of perry pears leuco-anthocyanin. *Ann. Rep. Agric. Hort. Res. Stat. Long Aston*, 140-143.

CAVENTOU E., WILM E., 1869. Action du permanganate de potassium sur la cinchonine. *C. R. Acad. Sci.*, **69**, 284-286.

CHAPMAN A. C., 1907. D'après CHAPON *et al.*, 1966.

CHAPON L., CHOLLOT B., URION E., 1961. Étude physicochimique des associations entre protéines végétales et substances polyphénoliques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **43**, 429-441.

CHAPON L., CHOLLOT B., URION E., 1961. Oxydation peroxydasique des bières : phénomènes fondamentaux. *Eur. Brew. Conv. Amsterdam*, 319-334.

CHAPON L., CHEMARDIN M., 1963. Rôle des tannoïdes de l'orge dans la génèse des troubles des bières. *Eur. Brew. Conv. Bruxelles*, 183-220.

CHAPON L., CHEMARDIN M., CHOLLOT B., 1966. Pouvoir tannant des tannoïdes. *Eur. Brew. Conv. Stockholm*, 372-386.

CHEVALLIER P., CHOLLOT B., CHAPON L., URION E., 1961. Contribution des levures à la stabilité des bières : leur pouvoir adsorbant sur les tannoïdes. *Eur. Brew. Conv. Amsterdam*, 246-259.

CROMWELL B. T., 1951. In PEACH K., TRACEY M. V., *Modern Methoden der Pflanzenanalyse*, IV, 393-404. Springer Verlag. Berlin.

DUDEN R., 1964. Die Herstellung von klaren Apfelsaft ohne Anwendung von filtration Enzymen. *Fruchsaft. Ind.*, **9**, 69-74.

FEAR C. M., 1929. The alcaloid test for tanins. *Analyst*, **54**, 316-318.

GADAL P., BOUDET A., 1965. Sur l'inhibition des enzymes par les tanins des feuilles de *Quercus sessilis* EHRH : inhibition de la β-amylase. *C. R. Acad. Sci.*, **260**, 4252-4255.

GOLDSTEIN J. L., SWAIN T., 1965. The inhibition of enzymes by tanins. *Phytochem.* **4**, 185-192.

GUINOT Y., MENORET Y., 1965. L'extraction continue du jus de pomme par essorage. *C. R. Acad. Agric. Fr.*, **51**, 858-866.

HAREL E., MAYER A. M., SHAIN Y., 1965. Purification and multiplicity of catechol-oxydases from apple chloroplast. *Phytochem.*, **4**, 783-790.

JACQUIN P., BRUGIRARD A., TAVERNIER J., 1952. Étude technologique des variétés de pomme à cidre. *Ann. Technol. agric*, **1**, 45-63. Voir aussi JACQUIN et *al*, Études technologique, I, II, III, IV. Groupement National des Producteurs de Fruits à Cidre. Paris.

JACQUIN P., TAVERNIER J., 1956. Test viscosimétrique pour déterminer l'aptitude à la défécation des moûts de pomme à cidre. *Industr. Alim. Agric.*, **73**, 161-169.

LUCKWILL L. C., POLLARD A., 1963. *Perry Pears*, 261 pages. N. F. C. I. Bristol.

MARTIN L., 1948. *Beitrag zur Kenntnis der linden Wein*, 59 p. Neographic G. m. b. H.

MONTIES B., BARRET A. 1965. Étude chimique d'un trouble au froid reversible présent dans un jus de pomme. *Ann. Technol. Agric.*, **14**, 167-172.

NEGRE E., 1945. *Contribution à l'étude des matières tannoïdes des vins*. 45 p. Thèse Montpellier.

NEUMANN J., LEGRAND G., LEHONGRE G., LAVOLLAY J., 1960. Spécificité de l'acide chlorogénique et des flavoïdes-*o*-diphénolique, comme coenzyme de la polyphénoloxydase dans l'oxydation de l'acide ascorbique. *C. R. Acad. Sci. Fr.* **251**, 3091-3093.

NORMAN P. J., HUGUES E. B., 1936. The tanin content of tea. *Analyst.*, **61**, 303-314.

POLLARD A., KIESER M. E., SISSONS D. J., 1958. Inactivation of pectic enzymes by fruits phenolics. *Chem. and Industry*, 952.

ROBERTS E. A. H., 1957. Oxydation reduction potential in tea fermentation. *Chem. and Industry*, 1354-1355.

ROBERTS E. A. H., 1962. In GEISSMAN T. A., *The chemistry of flavonoïd compounds*, 468-513. Pergamon Press.

ROELOFSEN P. A., 1958. Fermentation, drying and storage of cacao beans. *Adv. in Food Res*, **8**, 226-296.

SINGLETON V. L., ROSSI T. A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent. *Amer. J. Œnol. Vitic.*, **16**, 144-158.

SOMERS T. C., 1966. Wine tanins : isolation of condensed flavonoïd pigments by gel filtration. *Nature*, **209**, 368-370.

SPIERS C. W., 1914. The estimation of tanin in cider. *J. agric. Sci.*, **6**, 77-83.

STOCKS H. B., GREENWOOD C. V., 1925. Nature of the reaction between tanins and carbohydrates. *J. Soc. Leather. Trade Chem.*, **9**, 315. Abst. in *Analyst* 1925, **50**, 564-565.

WARCOLLIER G., 1928. *Cidrerie*, 484 p. Baillères et Fils, éd. Paris.

WARE A. H., SMITH V., 1933. Precipitation of alcaloïd by tanins and the use of antipyrine in the detection of tanins. *Pharm. J.*, **131**, 148-149. Abst. in *Analyst.*, **58**, 703-704.

WILLIAMS A. H., 1952. The tanin of apple juice and cider : an interpretation of the permanganate titration. *Annual. Rep. Agric. Hortic. Res. Stat. Long Aston*, 219-234.

WILLIAMS A. H., 1963. Enzyme inhibition by phenolic compounds in PRIDHAM J. B., *Enzyme Chemistry of Phen. Comp.*, 87-95, Pergamon Press.

WRIGHT H. E., BURTON W. W., BERRY R. C., 1964. Soluble browning reaction pigment of aged burley tobacco. *Phytochemistry.*, **3**, 525-533.

ZAPROMETOV M. H., 1964. Biochimie des catéchines, biosynthèse. Transformation et utilisation pratique (titre traduit), 465 p. Acad. Sci., U R S S. Institut de Physiologie végétale, Timiriasef.

Ann. Technol. agric., 1966, **15** (4), 349-358.

ÉTUDE DE L'INACTIVATION PAR LA CHALEUR DE LA POLYPHÉNOLOXYDASE DU JUS DE POMME

M. DEMEAUX et P. BIDAN

Station de Technologie végétale, Route de Saint-Cyr, 78 - Versailles

SOMMAIRE

Dans le but de préciser les normes de pasteurisation du jus de pomme afin de prévenir le brunissement enzymatique dû à la polyphénoloxydase, l'inactivation thermique de cet enzyme est étudiée.

Après la mise au point d'une technique de chauffage du jus, les auteurs examinent l'influence de différents facteurs (temps et température de chauffage, pH, variété de pomme) sur le comportement de la polyphénoloxydase.

I. — INTRODUCTION

Le brunissement enzymatique des fruits et légumes est dû principalement à la polyphénoloxydase. Il vaudrait mieux dire, d'ailleurs, les polyphénoloxydases car l'enzyme a des caractéristiques très différentes selon son origine : pomme de terre, champignon... (Bendall et Gregory, 1963). Récemment, on a même isolé 3 fractions différentes par chromatographie sur DEAE-cellulose et par électrophorèse sur gel d'amidon à partir de la polyphénoloxydase de pomme (Harel, Mayer et Shain, 1965).

Ce complexe enzymatique a cependant une unité de structure et d'action. C'est un métallo-enzyme dont le groupement prosthétique est le cuivre qui sert de transporteur d'électrons. Il est capable de catalyser 2 réactions différentes : l'hydroxylation de certains monophénols en *o*-diphénols et l'oxydation des *o*-diphénols en *o*-quinones. Ces réactions constituent la première étape d'une chaîne d'oxydo-réduction conduisant à la formation de corps oxydés colorés. La conséquence pratique de ce phénomène est de provoquer un brunissement enzymatique qui, s'il peut être jugé utile sur le plan technique, n'est pas apprécié du consommateur qui préfère les jus pâles, peu colorés. De plus, cette oxydation entraîne une diminution de la valeur nutritionnelle par destruction de l'acide ascorbique des jus de fruits.

Pour prévenir ce brunissement et protéger l'acide ascorbique, le moyen le plus couramment utilisé est l'inactivation de la polyphénoloxydase par la chaleur. En vue de définir des normes de pasteurisation permettant la destruction de cet enzyme, nous avons étudié son comportement vis-à-vis de la chaleur dans le jus de pomme.

II. — MÉTHODES EXPÉRIMENTALES ET MATÉRIEL UTILISÉ

Nos essais ont été réalisés sur le jus de pomme de la variété *Reine des Reinettes*. Cette pomme est intéressante pour notre étude car c'est une variété courante que l'on trouve durant une grande période (juin à octobre) et son jus brunit rapidement.

1° *Préparation du jus de pomme*

L'oxydation entraîne une diminution de l'activité de la polyphénoloxydase, les produits de la réaction étant inhibiteurs pour l'enzyme ; il faut donc l'éviter au maximum au cours de la préparation du jus.

Les pommes sont tout d'abord refroidies à + 4°C. Puis l'extraction du jus est faite avec une centrifugeuse « Moulinex » munie d'un filtre qui essore les pommes après râpage. Cette préparation entraîne un important brassage du jus qui brunit rapidement si on ne fait pas un refroidissement préalable des pommes. S'il est préparé dans de bonnes conditions le jus obtenu est pulpeux et peu coloré.

Le chauffage doit intervenir immédiatement pour éviter les risques d'altération.

2° *Chauffage du jus*

Nous avons été conduits à employer deux procédés de chauffage, l'un pour les temps courts inférieurs à 1 minute, l'autre pour les temps supérieurs.

a) *Chauffage long.*

Ces essais ont été réalisés dans des tubes en verre mince de petit diamètre (5 mm) pouvant contenir 2 ml de jus. Les tubes sont mis dans un bain-marie à la température désirée et la montée en température se fait en 30 secondes minimum, quelle que soit la température à atteindre.

La précision est suffisante pour des chauffages variant de 1 à 20 minutes mais l'inertie thermique est trop importante pour des temps de chauffage plus courts.

b) *Chauffage court.*

Le problème est d'avoir une montée en température rapide avec une précision suffisante quelle que soit la température. Ceci a été obtenu grâce à un appareil construit au laboratoire en nous inspirant de celui décrit par DIMICK, PONTING et MAKOWER (1951).

Le jus circule en continu dans l'appareil (fig. 1) à l'aide d'une pompe à galets dont le débit est fixé à 350 ml/minute. Le chauffage du jus est obtenu dans un tube en acier inoxydable de 6 mm de diamètre et de 1,50 m de long passant dans un manchon où arrive de la vapeur sous pression.

La montée en température se fait en un temps de 8 secondes fixé par les caractéristiques de l'appareil. La température est réglée à ± 0,5°C par l'arrivée de vapeur dans le manchon.

Puis la température du jus est maintenue dans un tube de chambrage calorifugé de 0,50 m de longueur. La durée du chambrage est réglable de 1 à 45 secondes en faisant varier le diamètre de ce tube (5 mm à 25 mm). Des thermomètres placés à l'entrée et à la sortie de la section de chambrage permettent le contrôle de la température.

Le jus passe ensuite dans un réfrigérant à eau puis il est recueilli dans un récipient plongé dans la glace.

3° *Mesure de l'activité de l'enzyme*

PONTING et JOSLYN (1948) ont mis au point une méthode colorimétrique de dosage de l'activité de la polyphénoloxydase par l'oxydation d'un *o*-diphénol, le pyrocatéchol, en une *o*-benzoquinone colorée en jaune-brun. La vitesse d'apparition de la coloration est proportionnelle à l'activité enzymatique. Pour ces auteurs, la variation de densité optique en fonction du temps est linéaire. Cela est vrai pour des temps de réaction courts et de faibles concentrations d'enzyme. Mais les produits d'oxydation formés à partir du catéchol et aussi des polyphénols de la pomme, sont inhibiteurs pour

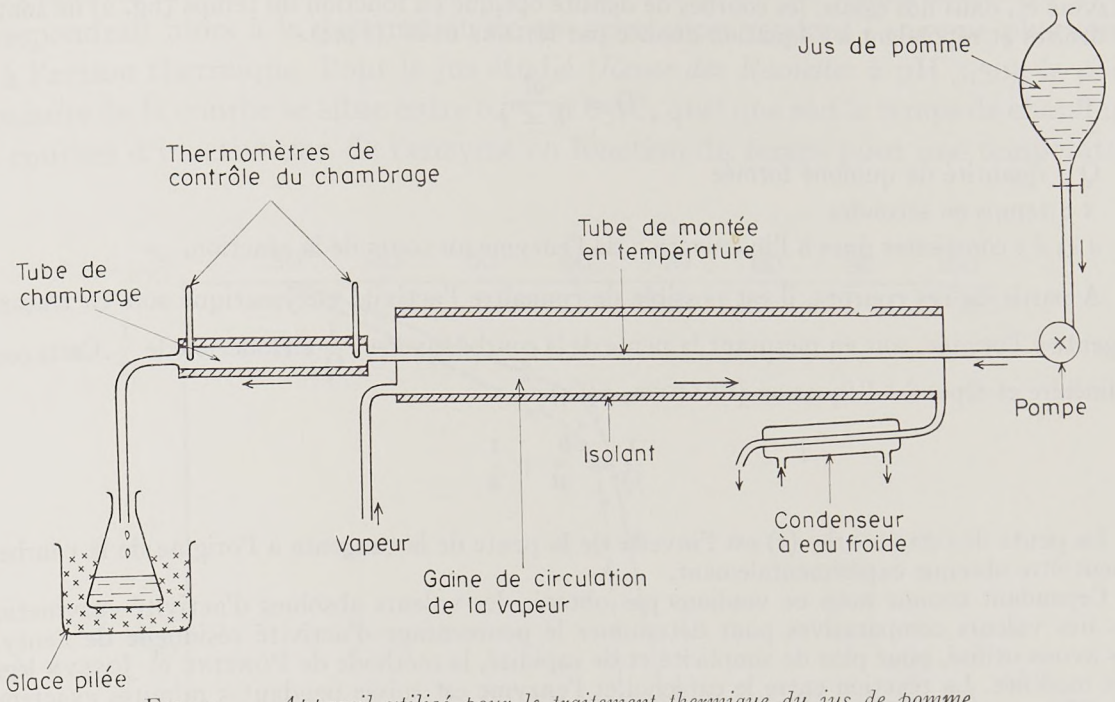


FIG. 1. — *Appareil utilisé pour le traitement thermique du jus de pomme*

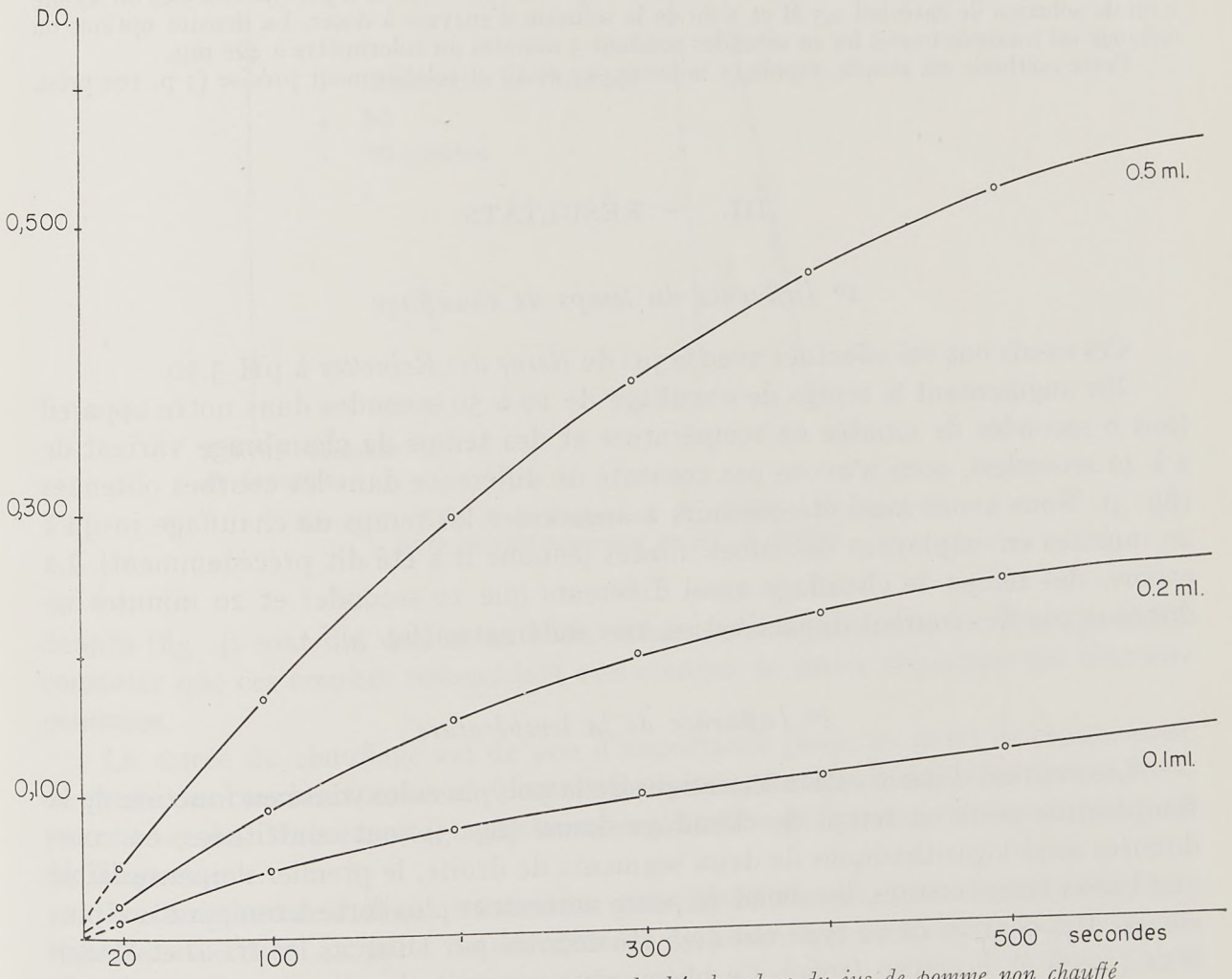


FIG. 2. — *Oxydation du pyrocatéchol par la polyphénoloxydase du jus de pomme non chauffé*

l'enzyme et, dans nos essais, les courbes de densité optique en fonction du temps (fig. 2) ne sont pas des droites et répondent à l'équation donnée par MILLER et *al* .(1944).

$$Q = \frac{at}{b + t} \qquad (1)$$

Q : quantité de quinone formée

t : temps en secondes

a et b : constantes dues à l'inactivation de l'enzyme au cours de la réaction.

A partir de ces courbes, il est possible de connaître l'activité enzymatique soit en traçant la tangente à l'origine, soit en mesurant la pente de la courbe inverse, $\frac{1}{Q}$ en fonction de $\frac{1}{t}$. Cette courbe est linéaire et répond à l'équation (PEACOCK, 1964)

$$\frac{1}{Q} = \frac{b}{at} + \frac{1}{a} \qquad (2)$$

La pente de cette courbe (2) est l'inverse de la pente de la tangente à l'origine de la courbe (1) et peut-être obtenue expérimentalement.

Cependant comme nous ne voulions pas obtenir des valeurs absolues d'activité enzymatique, mais des valeurs comparatives pour déterminer le pourcentage d'activité résiduelle de l'enzyme, nous avons utilisé, pour plus de simplicité et de rapidité, la méthode de PONTING et JOSLYN légèrement modifiée. La réaction entre le catéchol et l'enzyme est suivie pendant 5 minutes exactement et la différence de densité optique entre le début et la fin de la réaction est notée et considérée comme proportionnelle à l'activité enzymatique. La comparaison avec l'activité d'un jus témoin non chauffé permet de donner le pourcentage d'inhibition de l'enzyme.

Pour le dosage proprement dit, à 20 ml de tampon acétate 0,01 M à pH 5,0 et 25°C, on ajoute 2 ml de solution de catéchol 0,5 M et 1 ml de la solution d'enzyme à doser. La densité optique du mélange est mesurée toutes les 20 secondes pendant 5 minutes au colorimètre à 420 mμ.

Cette méthode est simple, rapide (5 minutes par essai) et relativement précise (5 p. 100 près).

III. — RÉSULTATS

1° *Influence du temps de chauffage*

Ces essais ont été effectués avec le jus de *Reine des Reinettes* à pH 3,50.

En augmentant le temps de chauffage de 10 à 50 secondes dans notre appareil (soit 8 secondes de montée en température et des temps de chambrage variant de 2 à 42 secondes), nous n'avons pas constaté de différence dans les courbes obtenues (fig. 3). Nous avons ainsi été conduits à augmenter les temps de chauffage jusqu'à 20 minutes en employant des tubes minces (comme il a été dit précédemment). Là encore, des temps de chauffage aussi différents que 10 secondes et 20 minutes ne donnent pas des courbes d'inactivation très différentes (fig. 3).

2° *Influence de la température*

Les courbes d'inactivation thermique de la polyphénoloxydase en fonction de la température pour un temps de chauffage donné (fig. 3) sont constituées, en coordonnées semi-logarithmiques de deux segments de droite, le premier de pente faible aux basses températures, le second de pente nettement plus forte à température plus élevée. Des courbes de ce type ont déjà été décrites par DIMICK, PONTING et MAKOWER (1951) et PONTING (1960). Ce phénomène pourrait s'expliquer par un effet de

protection dû à des substances thermolabiles. Le point de changement de pente correspondrait alors à la destruction de ces substances rendant l'enzyme plus sensible à l'action thermique. Pour le jus étudié (*Reine des Reinettes* à pH 3,50), le point de cassure de la courbe se situe entre 62°C et 65°C, quel que soit le temps de chauffage. Les courbes d'inactivation de l'enzyme en fonction du temps pour une température

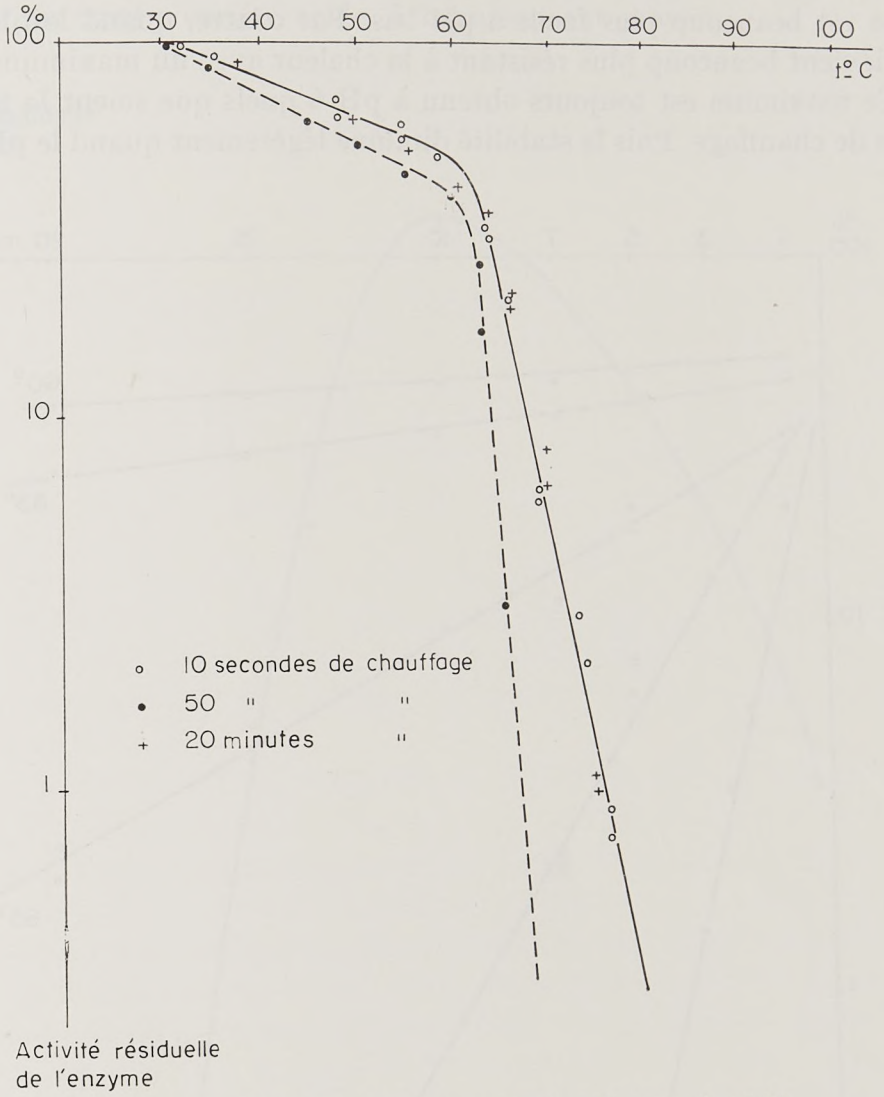


FIG. 3. — *Effet de la température de chauffage sur l'activité de la polyphénoloxydase du jus de pomme*

donnée (fig. 4) sont des droites en coordonnées semi-logarithmiques. Nous pouvons constater que ces courbes ressemblent aux courbes de survie classiques des microorganismes.

La durée du chauffage est de peu d'importance jusqu'au point de changement de pente des courbes tracées en fonction de la température, c'est-à-dire 62°C à 65°C pour nos essais. Mais ensuite, la destruction s'accélère et le temps de chauffage prend de l'importance.

La température critique à atteindre pour l'inhibition du brunissement enzymatique se situe donc au point de changement de pente, soit 62°C-65°C pour le jus de pomme étudié.

3° *Influence du pH*

Toujours avec le jus de pomme de *Reine des Reinettes*, nous avons étudié l'influence du pH sur la sensibilité de l'enzyme à la chaleur. Les résultats sont donnés dans la figure 5.

Le pH du jus a une grande influence et la dénaturation thermique de la polyphénoloxydase est beaucoup plus facile à pH bas. Par contre, quand le pH augmente, l'enzyme devient beaucoup plus résistant à la chaleur avec un maximum de stabilité à pH 6. Ce maximum est toujours obtenu à pH 6 quels que soient la température et le temps de chauffage. Puis la stabilité diminue légèrement quand le pH augmente.

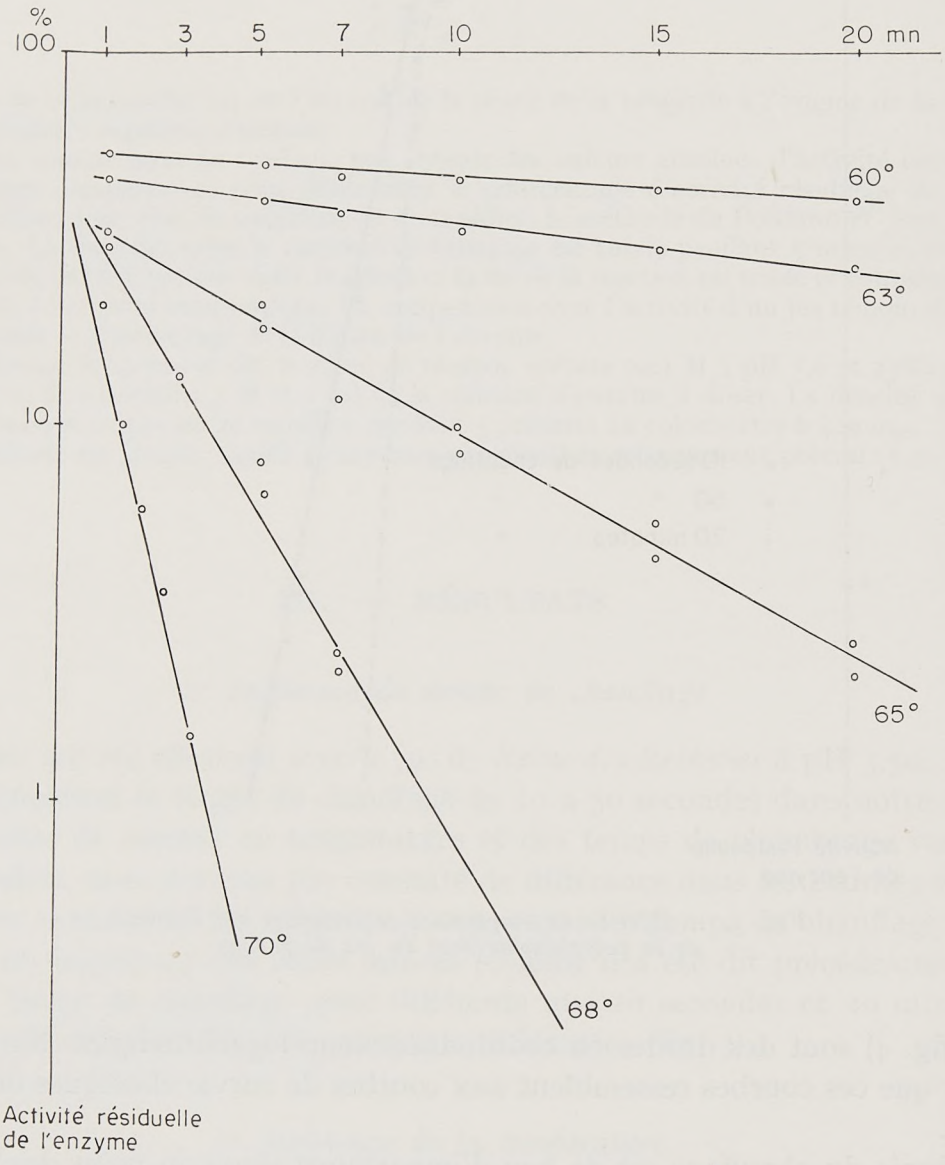


FIG. 4. — *Effet du temps et de la température de chauffage sur l'activité de la polyphénoloxydase du jus de pomme*

Il faut remarquer que ces courbes correspondent également à l'activité enzymatique du jus qui est minimum à pH bas puis augmente jusqu'à pH 6 où elle est maximum et diminue légèrement ensuite.

4° *Influence de la variété*

Nous avons étudié la stabilité de la polyphénoloxydase à la chaleur pour différentes variétés de pomme d'intérêt industriel ayant des caractéristiques de brunissement très différentes. Ce sont les variétés :

— *Damelot* : variété peu acide, à brunissement assez intense,

— *Cœur de bœuf* : variété acide, à brunissement moyen,

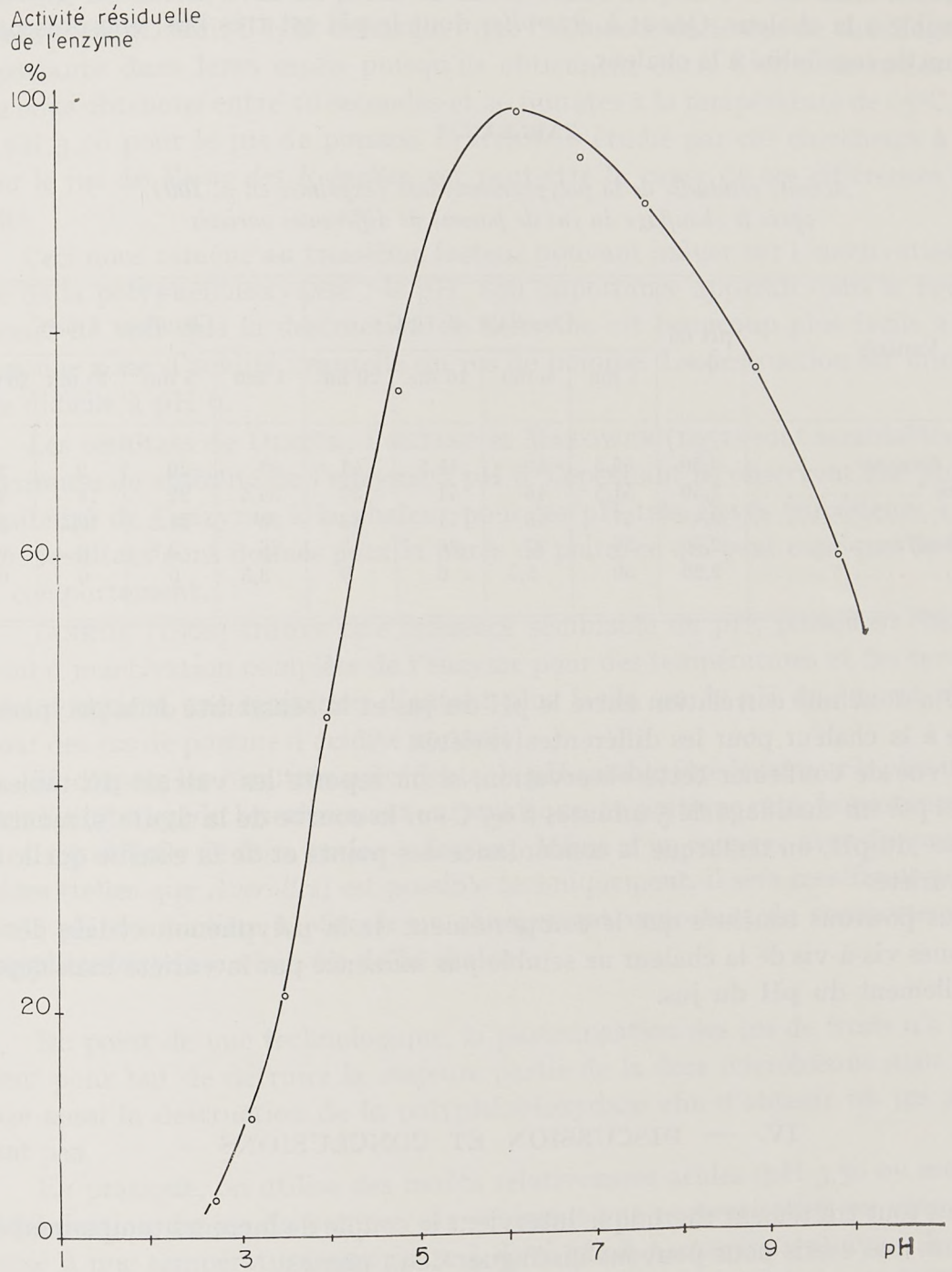


FIG. 5. — *Influence du pH sur l'inactivation par la chaleur de la polyphénoloxydase du jus de pomme*

— Chauffage de 5 minutes à 65°
— Le pH est ajusté avec ClH ou NaOH

— *Chuero-Briz* : variété très amère, à brunissement marqué,

— *Averolles* : variété très acide, de grand intérêt pour les coupages, ne brunissant pas.

Les valeurs de pH de ces différents jus de pomme (tabl. 1) sont plus faibles que les valeurs moyennes trouvées pour des jus des mêmes variétés obtenus par brassage. Cela pourrait être dû, en particulier, aux modes différents d'extraction du jus.

Les résultats des essais consignés dans le tableau 1 font apparaître un comportement semblable des 3 variétés *Reine des Reinettes*, *Damelot* et *Chuero-Briz* dont le pH du jus est le même. *Cœur de bœuf*, dont le pH est inférieur aux précédentes, est plus sensible à la chaleur. Quant à *Averolles* dont le pH est très bas, elle présente le maximum de sensibilité à la chaleur.

TABLEAU 1

Activité résiduelle de la polyphénoloxydase (exprimée en p. 100) après le chauffage du jus de pomme de différentes variétés

Variétés	pH du jus	Chauffage à 60°C				Chauffage à 65°C			
		1 mn	5 mn	10 mn	20 mn	1 mn	5 mn	10 mn	20 mn
Reine des Reinettes	3,50	56,5	49	45,5	41	31	20	9	2,5
Chuero-Briz	3,50	51,5	46	41	37	34,5	22	11	3,3
Damelot	3,45	57	46	41	38	33	21,5	10,5	2,9
Cœur de bœuf	2,60	56	37	26	15	26	2,8	0	0
Averolles	2,20	50	5,3	0	0	8,5	0	0	0

Il y a donc une corrélation entre le pH du jus et la sensibilité de la polyphénoloxydase à la chaleur pour les différentes variétés.

En vue de confirmer cette observation, si on reporte les valeurs du tableau 1 obtenues par un chauffage de 5 minutes à 65°C sur la courbe de la figure 5, montrant l'influence du pH, on remarque la concordance des points et de la courbe quelle que soit la variété.

Nous pouvons conclure que le comportement de la polyphénoloxydase des jus de pommes vis-à-vis de la chaleur ne semble pas influencé par la variété mais dépend essentiellement du pH du jus.

IV. — DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Dans tout traitement thermique intervient le couple de facteurs temps-température. Dans nos essais nous pouvons distinguer deux phases :

— Jusqu'au point de changement de pente, une première zone de température dans laquelle une augmentation de température provoque une faible inactivation de l'enzyme alors que des temps de chauffage prolongés sont sans effet. Dans cette

zone, l'effet de destruction de l'enzyme est obtenu pendant la montée en température (8 secondes dans notre appareil, 30 secondes dans les tubes minces), le temps de chambrage supplémentaire n'apportant pas un résultat proportionnel à la dépense d'énergie.

— Puis une deuxième zone de température dans laquelle le temps a une influence marquée. Dans cette zone, l'inhibition du brunissement enzymatique est définie par un couple température-temps.

Les courbes obtenues par DIMICK, PONTING et MAKOWER (1951) sont du même type que les nôtres avec un point de changement de pente et les deux zones définies précédemment. Mais il faut remarquer que l'influence du temps de chauffage est plus importante dans leurs essais puisqu'ils obtiennent entre 8 et 50 secondes les effets que nous obtenons entre 10 secondes et 20 minutes à la température de 65°C. L'écart, de pH 3,10 pour le jus de pomme *Gravenstein* étudié par ces chercheurs à pH 3,50 pour le jus de *Reine des Reinettes*, est peut-être la cause de ces différences de sensibilité.

Ceci nous ramène au troisième facteur pouvant influer sur l'inactivation thermique de la polyphénoloxydase : le pH. Son importance apparaît dans la figure 5 qui permet de voir que la destruction de l'enzyme est beaucoup plus facile à pH bas, dans une zone d'acidité naturelle du jus de pomme. La destruction est minimum et très difficile à pH 6.

Les résultats de DIMICK, PONTING et MAKOWER (1951) sont semblables avec un maximum de stabilité de l'enzyme à pH 6. Cependant ils observent une plus grande sensibilité de l'enzyme à la chaleur pour les pH très élevés (supérieurs à 6). Mais leurs résultats sont donnés pour la purée de poire, ce qui peut expliquer la différence de comportement.

JANKOV (1962) trouve une influence semblable du pH, puisqu'en cherchant le point d'inactivation complète de l'enzyme pour des températures et des temps variables, il obtient une inhibition d'autant plus facile que le pH du jus est plus faible (pour des jus de pomme d'acidité normale).

Si, d'après les résultats précédents, le pH semble être le facteur le plus important dans l'inhibition du brunissement enzymatique, en pratique cette importance diminue car il est difficile de faire varier ce facteur. Même si un coupage avec des pommes très acides (telles que *Averolles*) est possible techniquement, il sera insuffisant pour abaisser le pH de manière à obtenir un changement important du comportement de la polyphénoloxydase vis-à-vis de la chaleur.

Du point de vue technologique, la pasteurisation des jus de fruits n'a pas seulement pour but de détruire la majeure partie de la flore microbienne mais elle envisage aussi la destruction de la polyphénoloxydase afin d'obtenir un jus ne brunissant pas.

En pratique, on utilise des moûts relativement acides (pH 3,50 ou moins) pour la fabrication du jus de pomme. Ils subissent une pasteurisation en vrac de courte durée à une température supérieure à 80°C (*flash-pasteurisation*) avant le stockage. Puis, lors du conditionnement en bouteilles, les jus sont soumis à une deuxième pasteurisation à une température de 65°C pendant 20 minutes. D'après nos essais, le premier traitement thermique doit être amplement suffisant à lui seul pour inactiver

totalement la polyphénoloxydase, quelle que soit l'acidité du jus. Dans ces conditions, il n'y a donc pas de risques de brunissement enzymatique du jus de pomme.

Un autre moyen d'inhibition de la polyphénoloxydase, couramment utilisé en cidrerie, est l'emploi du SO_2. Grâce à son action protectrice, il est possible d'éviter un brunissement enzymatique même dans un cidre ayant subi une pasteurisation basse de 20 minutes à 65°C, conditions inférieures, d'après nos essais, à celles nécessaires pour l'inactivation complète de l'enzyme.

Reçu pour publication en juin 1966.

SUMMARY

STUDY OF THE INACTIVATION OF APPLE JUICE POLYPHENOLOXIDASE BY HEAT

Thermal inactivation of polyphenoloxidase was studied for defining precisely the standards for apple juice pasteurisation to control enzymatic browning.

The thermal treatment was carried out either in thin glass tubes (for heating times greater than 1 minute) or in a laboratory-built apparatus (for heating times less than 1 minute).

Residual enzyme activity was measured with pyrocatechol as a substrate by PONTING and JOSLYN's method, modified by the author.

By varying heating time and temperature, a critical temperature can be determined above which thermal destruction of polyphenoloxidase is more easy. pH of the juice is of great importance on the thermal enzyme stability; this stability is maximum at pH 6. The variety of apples does not seem to affect the phenoloxidase stability.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BENDALL D. S., GREGORY R. P. F., 1963. Purification of phenol oxidases. In PRIDHAM J. B. *Enzyme chemistry of phenolic compounds.*, 7-24, Pergamon Press.

DIMICK K. P., PONTING J. D., MAKOWER B., 1951. Heat inactivation of polyphenolase in fruit purees. *Food Technol.*, **5**, 237-241.

HAREL E., MAYER A. M., SHAIN Y., 1965. Purification and multiplicity of catechol oxidase from apple chloroplasts. *Phytochemistry*, **4**, 783-790.

JANKOV S. I., 1962. Hitze Inaktivierung der Polyphenoloxydasen in einigen Fruchtsäften. *Fruchtsaft. Ind.*, **7**, 13-32.

JOSLYN M. A., PONTING J. D., 1951. Enzyme-catalyzed oxidative browning of fruit products. *Adv. Food. Res.*, **3**, 1-44.

KERTESZ D., ZITO R., 1962. Phenolase. In HAYAISHI O. *Oxygenases*. 307-354. Academic Press.

MILLER W. H., MALLETTE M. F., ROTH L. J., DAWSON C. R., 1944. A new method for the measurement of tyrosinase catecholase activity. II. Catecholase activity based on the initial reaction velocity. *J. amer. chem. Soc.*, **66**, 514-518

PEACOCK B. C., 1964. A colorimetric method for the measurement of polyphenoloxidase activity. *Queensland J. agric. Sci.*, **21**, 255-259.

PONTING J. D., 1960. The control of enzymatic browning of fruits. In SCHULTZ H. W. *Food Enzymes*, 105-124. AVI publishing Company, Westport.

PONTING J. D., JOSLYN M. A., 1948. Ascorbic acid oxidation and browning in apple tissue extract. *Arch. Biochem.*, **19**, 47-63.

Ann. Technol. agric., 1966, **15** (4), 359-401.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES COMBINAISONS DE L'ANHYDRIDE SULFUREUX DANS LES MOÛTS ET LES VINS (1)

Deuxième partie (2)

J. BLOUIN

Station agronomique et œnologique de Bordeaux (3)

(1) Cette étude a fait l'objet d'une thèse de Docteur-Ingénieur, soutenue à la Faculté des Sciences de l'Université de Bordeaux.

(2) La première partie de ce mémoire a été publié dans le numéro 3, 1966 des Annales de Technologie agricole.

(3) Adresse actuelle : Centre d'Études et d'Informations œnologiques 33 - Cadillac-sur-Garonne.

CHAPITRE IV

LES ACIDES CARBONYLIQUES DES MOÛTS ET DES VINS

Nous avons vu qu'une partie importante de l'anhydride sulfureux contenu dans les moûts et les vins est combinée à des substances ayant des fonctions carbonyles. Nous avons cherché à établir la liste de ces substances en recherchant leur présence dans les moûts et les vins. Pour des raisons analytiques, nous avons divisé cette recherche en deux chapitres, l'un concernant les substances acides, l'autre les substances neutres.

I — Identification des acides carbonyliques

Il est possible de séparer et d'identifier les dinitrophénylhydrazones des acides carbonyliques par chromatographie sur papier ou sur couche mince de silice. En appliquant ces techniques aux acides carbonyliques des moûts et des vins, on constate l'existence de nombreux spots sur les chromatogrammes, donc de nombreux acides dans ces milieux. Pour la clarté de l'exposé, nous classerons ces spots selon leur fréquence dans des vins différents, leur importance et la sureté de leur identification par comparaison à des acides-témoins connus. Avant de conclure sur la présence certaine de tel ou tel acide, nous avons confirmé les identifications à l'aide d'autres méthodes analytiques.

1. Dans tous les cas, nous avons observé la présence de spots importants correspondant sans aucune ambiguïté à l'acide pyruvique et à l'acide α-cétoglutarique (fig. 16) ; ces acides sont identifiés également par dosage enzymatique spécifique. Comme nous l'avons déjà signalé (Blouin et Peynaud, 1963), on peut conclure à la présence constante de ces acides cétoniques dans les moûts et les vins. A part un travail, que nous ignorions à cette époque, sur quelques vins spéciaux russes (Egorov et Borissova, d'après Deibner, 1963), nos observations constituent la première identification et le premier dosage précis dans les moûts et les vins de ces constituants importants, en particulier par le rôle qu'ils jouent dans la combinaison de l'anhydride sulfureux.

2. Nous avons observé très souvent la présence de traces d'acide glyoxylique. La dinitrophénylhydrazone de cet acide apparaît toujours après révélation des chromatogrammes, comme une tache rouge brique, située légèrement au-dessus de la tache inférieure de l'acide pyruvique ; celle-ci masque parfois la présence de l'acide glyoxylique, car elle est beaucoup plus abondante. Le dosage colorimétrique par la

réaction de Schryver décrite au chapitre III, confirme l'existence de quelques mg d'acide glyoxylique par l dans la quasi-totalité des moûts et des vins examinés.

3. L'acide oxalacétique se sépare difficilement de l'acide α-cétoglutarique, toujours beaucoup plus abondant que lui. Son dosage enzymatique spécifique confirme cependant sa présence constante à des doses allant de 0,5 à 3 mg par l environ. C'est, à notre connaissance, la première fois que l'acide oxalacétique est signalé dans les moûts et les vins.

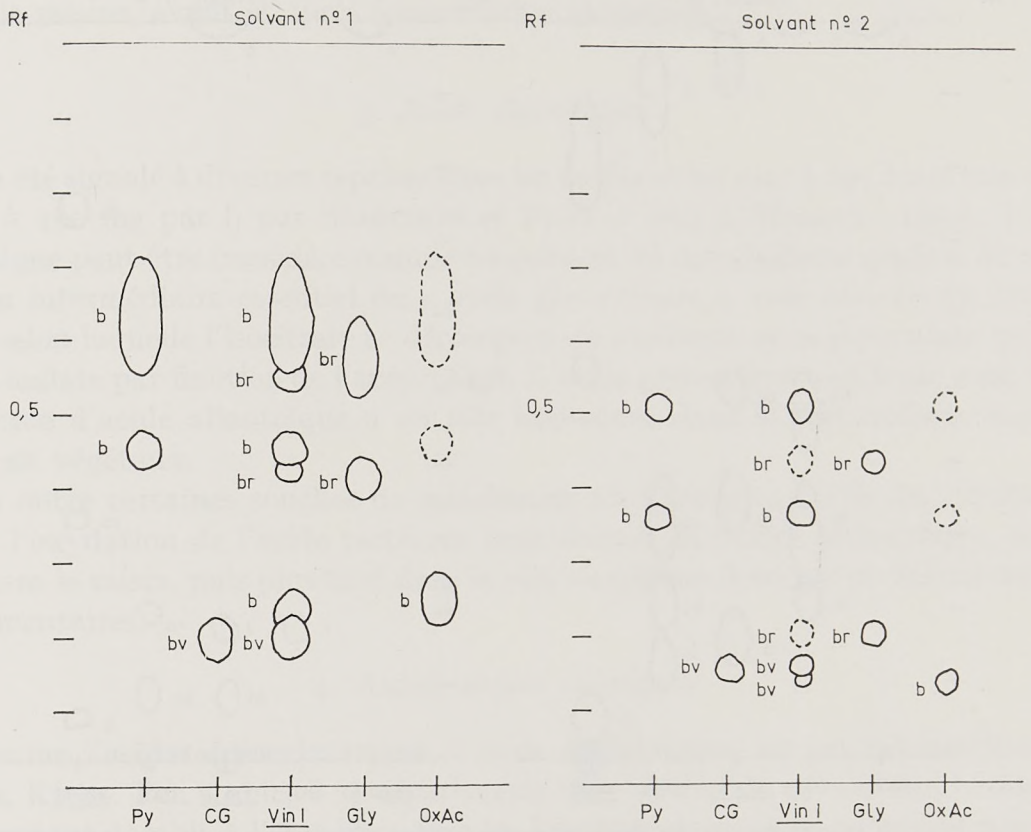


FIG. 16. — *Chromatographie des dinitrophénylhydrazones obtenues avec un vin (I).*
Ce graphique ne rassemble que les taches identifiées.

Abréviations : Py = acide pyruvique ; CG = acide α-cétoglutarique ;
Gly = acide glyoxylique ; OxAc = acide oxalacétique ;
DOT = acide dioxytartrique ; DOF = acide dioxyfumarique.
j = jaune ; b = brun ; v = vert ; r = rouge ; m = mauve ; bl = bleu ; rs = rose.
Solvant nº 1 : Butanol-éthanol-ammoniaque 0,5 N (7-1-2) sur papier Whatman nº 4.
Solvant nº 2. : Hexane-éther sulfurique-acide acétique-acide propionique (65-75-5-5) sur couche mince de silice G.

4. Dans tous les cas étudiés, nous avons observé la présence d'une tache brune de Rf $\simeq$ 1, se trouvant donc sur le front du solvant ; il pourrait s'agir d'acide acétylacétique (ou β cétobutyrique) dont la présence a été d'ailleurs prévue par GENEVOIS (1962) dans les milieux de fermentation.

5. Nous avons observé la présence constante d'autres taches, que nous n'avons pu identifier avec sûreté. Signalons seulement la présence possible dans certains vins d'acide dioxytartrique et dioxyfumarique (fig. 17).

6. Nous n'avons jamais rencontré d'acide mésoxalique, dont la séparation s'effectue pourtant parfaitement (Rf 0,50 à 0,60) d'avec les autres acides cétoniques (Rf > 0,70) par les solvants butanol-acide formique-eau ou pentanol-acide formique.

7. Il existe plusieurs autres acides non identifiés. Nous n'avons pu conclure quant à la présence des acides hydroxypyruvique, phénylpyruvique, diméthylpyruvique, α-cétobutyrique et lévulinique. L'ensemble de ces résultats a été confirmé par HÉBRÉ (*communication personnelle*, 1964), qui signale en outre la présence certaine d'acide lévulinique.

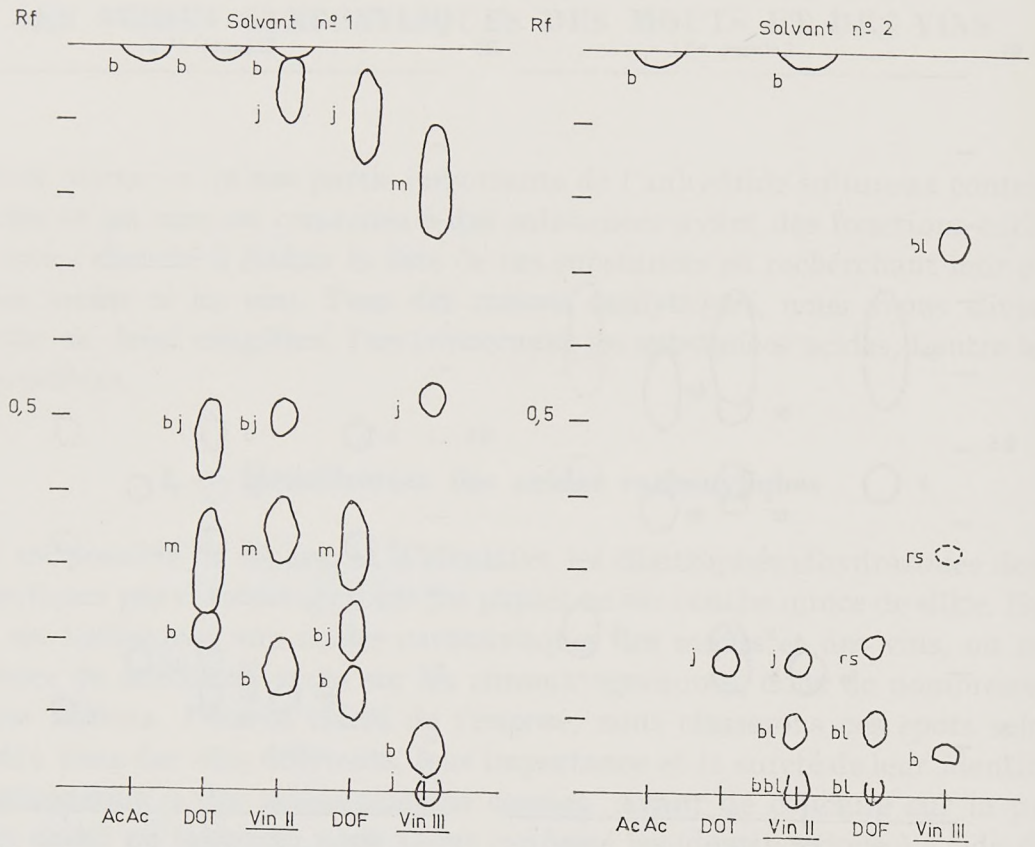


FIG. 17. — *Chromatographie des dinitrophénylhydrazones obtenues avec un vin (II et III).* Ce graphique ne reproduit que les taches non identifiées avec certitude. Mêmes abréviations que pour la fig. 16.

Les acides carbonyliques les plus importants nous étant connus après ces observations, nous étudierons brièvement leur métabolisme, afin de guider l'étude de leurs variations, puis de leur contrôle technologique.

II — Origine et métabolisme des acides carbonyliques

1. *Acide pyruvique*

Cet acide est considéré comme une « plaque tournante » dans les schémas des mécanismes chimiques de la respiration et des fermentations. Il peut se former à partir de multiples origines, oses, acides aminés divers, acide malique, etc. Il a été caractérisé depuis longtemps en laboratoire dans les milieux de fermentation alcoolique, aux pH neutres ou alcalins, plus particulièrement dans les cas de carence en

thiamine (LAFON, 1955). Sa présence a été signalée dans la bière (KUROIWA et KOKUBO, 1959) et dans le cidre (WHITING et COGGINS, 1960),

On ne saurait donc s'étonner de le rencontrer dans les moûts et les vins, comme nous l'avons observé pour la première fois.

2. *Acide α-cétoglutarique*

C'est un intermédiaire important du cycle tricarboxylique et le produit de la désamination de l'acide glutamique ; il est donc normal de le rencontrer dans les moûts de raisins, avant et après fermentation alcoolique.

3. *Acide glyoxylique*

Il a été signalé à diverses reprises dans les moûts et les vins à des doses très variables (3 à 200 mg par l) par SÉMICHON et FLANZY (1933), BARAUD (1954). L'acide glyoxylique peut être considéré comme un produit du métabolisme général du raisin. C'est un intermédiaire essentiel du « cycle glyoxylique », voie dérivée du cycle de Krebs, selon laquelle l'isocitrate se décompose en succinate et en glyoxalate qui conduit au malate par fixation de l'acétyl-CoA. L'acide glyoxylique condensé avec l'urée sous forme d'acide allantoïque a un rôle important dans le métabolisme azoté de nombreux végétaux.

En outre certaines souches de moisissures en forment à partir du citrate. Par ailleurs l'oxydation de l'acide tartrique peut donner de l'acide glyoxylique. Sa présence dans le raisin, puis plus tard dans le vin, s'explique donc par divers mécanismes complémentaires.

4. *Autres acides cétoniques*

Comme l'acide α-cétoglutarique, l'acide oxalacétique est un intermédiaire du cycle de Krebs. Peu stable, il se décarboxyle très facilement en acide pyruvique ; il est cependant dosable à l'état libre chez les Légumineuses. Dans les moûts et les vins il peut être protégé de la décarboxylation, et en quelque sorte stabilisé, par sa forme de combinaison avec l'anhydride sulfureux.

Il peut en être de même pour l'acide acétylacétique, résultant de la condensation de deux molécules d'acide acétique, dont la combinaison sulfitique échapperait partiellement à l'hydrolyse en acétone.

III — Teneur des moûts et des vins en acides carbonyliques

Les histogrammes de la figure 18 montrent la répartition des teneurs en acides pyruvique et α-cétoglutarique pour environ 200 vins blancs des récoltes 1961, 1962 et 1963. Le tableau 17 complète ces graphiques en indiquant les taux extrêmes observés.

L'analyse de plusieurs vins rouges a montré que ceux-ci contiennent également quelques dizaines de mg par l de chacun des acides cétoniques envisagés ici.

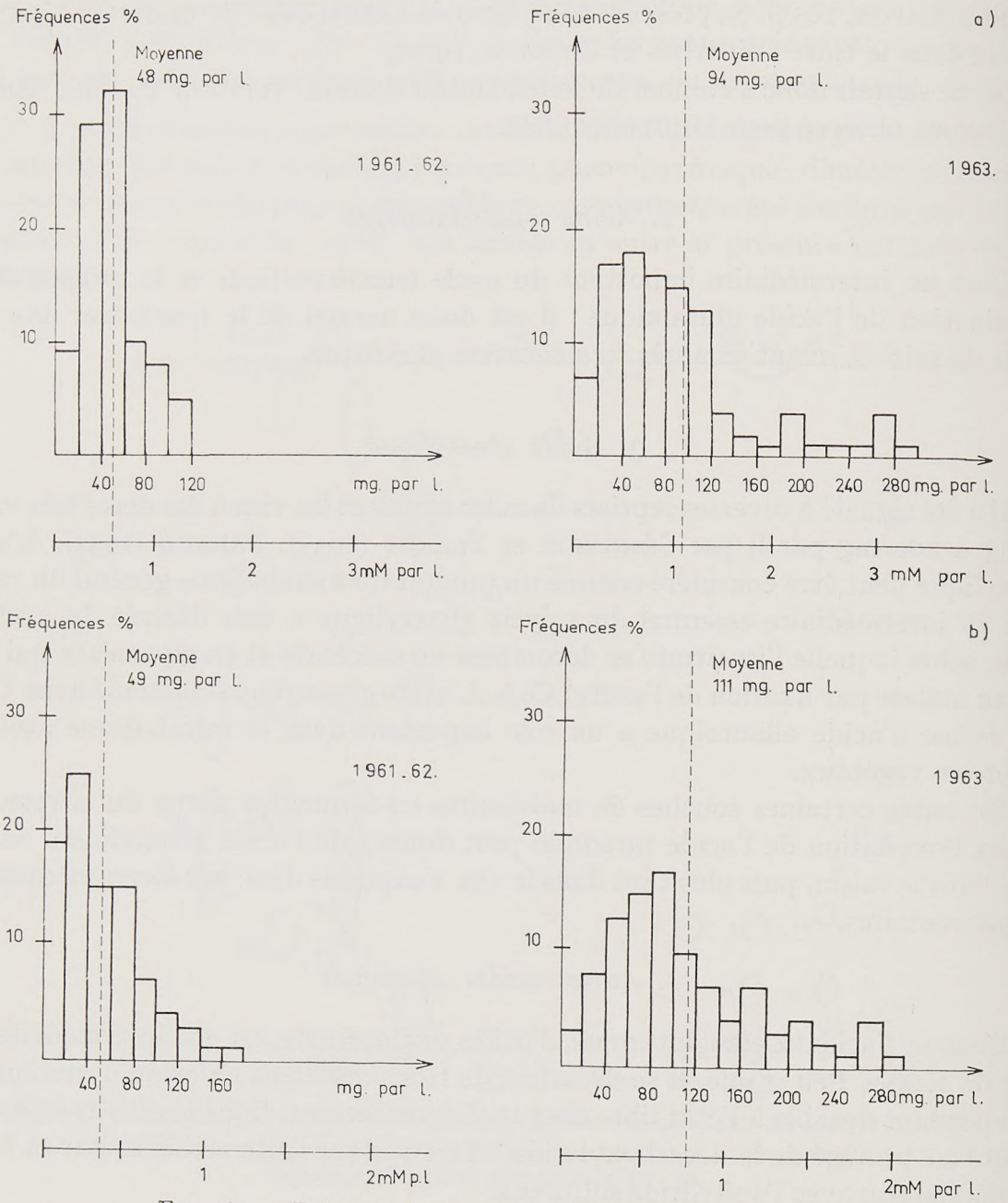


FIG. 18. — *Fréquence des teneurs des vins en acides cétoniques.*
Histogrammes concernant une centaine d'échantillons d'une part des récoltes 1961 et 1962, d'autre part de la récolte 1963.
a) acide pyruvique *b*) acide α-cétoglutarique.

TABLEAU 17

Acides cétoniques des vins blancs des récoltes 1961, 1962 et 1963

(Teneurs en mg par litre ; il a été analysé une centaine d'échantillons par récolte)

Teneurs	Acide pyruvique			Acide α-cétoglutarique		
	minimum	moyenne	maximum	minimum	moyenne	maximum
1961 et 1962	11	48	118	2	49	175
1963	13	94	460	13	111	346

On constate une grande variabilité des teneurs en acides cétoniques pour des vins d'une même récolte et surtout d'une récolte à une autre. Ce sont les conditions de la maturation et surtout l'état sanitaire des raisins qui influent sur ces taux. La récolte 1963 a été marquée par un manque de maturité et une pourriture excessive des raisins due à l'humidité des mois d'août et de septembre, alors que les raisins étaient généralement sains en 1961 et en 1962.

D'autre part la comparaison des teneurs de plusieurs dizaines de couples moûts de raisin et vins correspondants montre que le vin est souvent plus riche que le moût en acide α-cétoglutarique (70 à 80 p. 100 des cas) alors que l'acide pyruvique diminue dans 80 p. 100 des fermentations observées dans les années 1961 et 1962 et au contraire augmente toujours pour les moûts pourris de la récolte 1963.

Nous étudierons les variations des acides cétoniques dans les moûts, puis dans les vins.

1. *Les acides cétoniques dans les moûts*

L'analyse de plusieurs dizaines de moûts de différentes années donne une moyenne de 35 mg d'acide pyruvique et de 21 mg d'acide α-cétoglutarique par litre, avec respectivement 116 et 127 mg comme teneurs maximales. Faute d'un nombre suffisant d'études, nous ne pouvons conclure définitivement sur l'évolution des acides cétoniques durant la maturation. Nous avons observé une légère diminution lorsqu'on s'approche du terme de la maturité des raisins sains. Parfois cette faible diminution, qui porte sur 2 à 10 mg par l, est masquée par le développement de la pourriture. Cette dernière a en effet une action cétogène marquée, comme le montre le tableau 18 donnant les teneurs moyennes observées pour des raisins de *Sauternes* atteints de pourriture noble plus ou moins évoluée.

TABLEAU 18

Influence de la pourriture noble sur le taux d'acides cétoniques du moût

(Teneurs en mg par l de moût)

La pellicule des raisins « pourris pleins » est attaquée par *Botrytis cinerea*, mais les grains conservent leur forme.

Les raisins « rôtis » ont subi, avec un développement plus poussé de la moisissure, une dessiccation partielle qui diminue leur volume.

État du raisin	Acide pyruvique	Acide α-cétoglutarique
Sain	58	7
Pourri plein	35	20
Rôti	95	81

On voit que l'acide α-cétoglurarique augmente régulièrement avec l'importance de la pourriture, alors que le métabolisme de l'acide pyruvique est plus complexe. Nous avons repris cette étude au laboratoire avec des cultures sur moûts de bactéries et de moisissures, dans des conditions déjà décrites (p. 236). Le tableau 19 donne l'essentiel de ces résultats qui confirment les évolutions décrites.

En résumé les teneurs en acides cétoniques des moûts sont surtout fonction de l'état sanitaire des raisins et dépendent des attaques fongiques ou bactériennes qu'ils peuvent subir. Mais les vins peuvent avoir des teneurs en acides cétoniques très éloi-

TABLEAU 19

Influence du développement de bactéries et de moissisures sur la teneur en acides cétoniques d'un moût

(Teneurs en mg par litre)

Microorganisme cultivé	Durée de culture en jours	Acide pyruvique	Acide α-cétoglutarique
Moût témoin	—	45	16
Bactéries acétiques			
Souche *CR 86*.....	1	40	12
—	2	26	14
—	3	90	30
—	7	260	68
Souche *2-63-5*	7	24	12
Souche « Vin »	7	10	19
Moisissures diverses			
Souche n° 1	7	28	53
Souche n° 2	7	14	24
Souche n° 3	7	68	31
Souche n° 4	7	42	22

Remarque : Les souches de moisissure nos 1, 2, 3 et 4 sont isolées de raisins de différentes régions. Non identifiées botaniquement elles sont d'aspects très différents.

TABLEAU 20

Influence de la fermentation, avec ou sans sulfitage préalable, sur le taux d'acides cétoniques des vins

Teneurs en mg par l pour onze moûts de la récolte 1963.
Le sulfitage a été fait à 10 g d'anhydride sulfureux par hl

	Acide pyruvique			Acide α-cétoglutarique		
	Moût	Vin		Moût	Vin	
		Sans SO_2	Avec SO_2		Sans SO_2	Avec SO_2
Teneur minimum	5	22	38	2	20	44
Teneur moyenne	15	67	121	15	116	158
Teneur maximum	45	157	269	29	332	292

gnées de celles des moûts d'origine et les conditions de fermentation sont finalement déterminantes.

2. *Influence des conditions fermentaires sur les taux d'acides cétoniques des vins*

En 1963, nous avons comparé les teneurs pour onze moûts avec celles des vins qu'ils donnèrent ; les fermentations furent conduites avec ou sans sulfitage préalable.

Le tableau 20 résume les résultats de ces essais. Le sulfitage avant fermentation a augmenté le taux des acides cétoniques des vins obtenus dans environ 80 p. 100 des cas. Il s'agit sans doute d'un blocage chimique partiel par l'anhydride sulfureux, comparable au blocage bien connu pour l'éthanal (LAFON-LAFOURCADE, 1955) et que l'on peut interpréter comme une réaction de défense des levures.

Nous avons suivi dans quelques cas l'évolution des acides cétoniques au cours de la fermentation alcoolique, dans diverses conditions de contact avec l'air et de sulfitage. Les graphiques des figures 19 et 20 et plusieurs autres résultats qualitativement comparables observés en chai ou en laboratoire permettent de dégager quelques faits intéressants bien que notre expérimentation limitée dans le temps n'ait pu avoir à ce sujet le caractère systématique et complet souhaitable. Cette étude a été reprise récemment par S. LAFON-LAFOURCADE.

Le taux d'acides cétoniques varie beaucoup au cours de la fermentation. Nous avons observé (PEYNAUD et BLOUIN, 1965) que ces variations étaient accusées, et la valeur finale particulièrement élevée, dans le cas de moûts issus de raisins pourris. On peut rapporter cette observation, soit à une carence vitaminique, soit à la présence d'inhibiteurs d'origine fongique. L'aération et le sulfitage du moût ont un rôle important, qui reste à bien préciser. On constate en particulier que le taux d'acide pyruvique varie rapidement en fin de fermentation. On s'explique ainsi que le mutage en cours de fermentation puisse conduire à des taux variés de combinaison de l'anhydride sulfureux suivant le moment précis où il est effectué et suivant le point de la courbe d'évolution où il intervient.

Sur le plan biochimique, on peut remarquer que la décarboxylation de l'acide pyruvique en éthanal au cours de la fermentation est moins instantannée qu'on ne le croyait. L'acide pyruvique libre peut atteindre parfois la concentration de 10 mM par l. Il intervient dans le bilan des produits secondaires de la fermentation alcoolique (GENEVOIS, 1936-1962), d'une façon parfois importante.

Nous avons expérimenté l'influence d'une addition à un moût de raisin de divers acides aminés et de quelques acides organiques sur la formation des acides pyruvique et α-cétoglutarique restant à la fin de la transformation du sucre. L'addition d'acide glutamique augmente nettement les taux d'acides pyruvique et α-cétoglutarique. Les enrichissements en cystéine, en tryptophane, en asparagine, à raison de 5 mMol par litre, augmentent le taux de l'acide pyruvique seul. Les autres additions n'ont pas d'influence ou diminuent plutôt légèrement le taux des acides cétoniques. Il semble en tout cas que l'acide glutamique ne peut être la seule source d'acide α-cétoglutarique et que celui-ci n'est pas seulement un produit du métabolisme azoté. D'ailleurs il y a relativement peu d'acide glutamique dans les vins (moins de 100 mg par litre) et

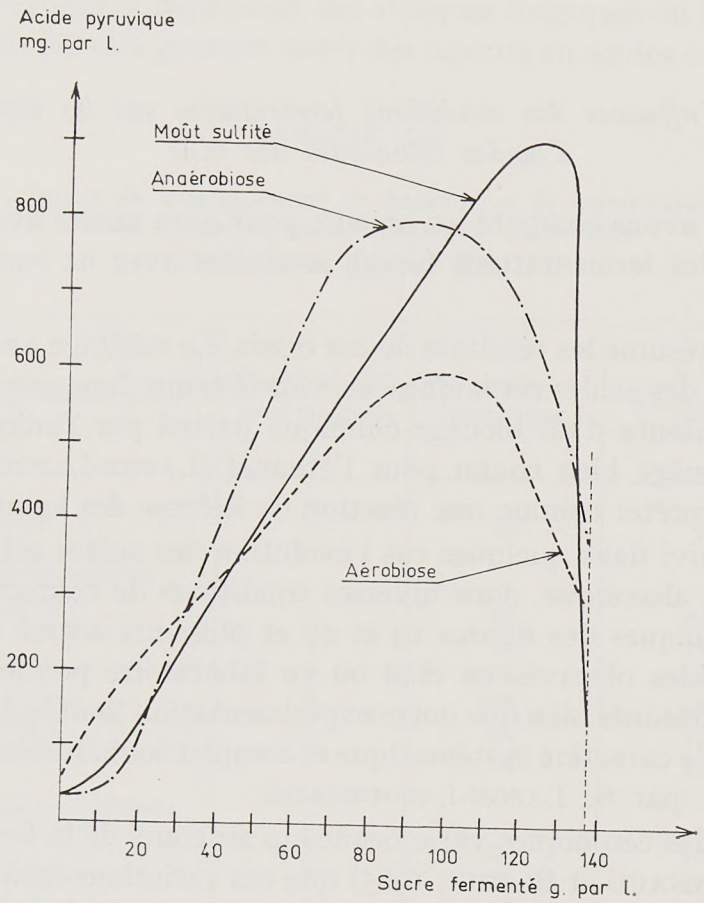


FIG. 19. — *Évolution de la teneur en acide pyruvique au cours de la fermentation d'un moût de raisin en fonction du sucre fermenté.*

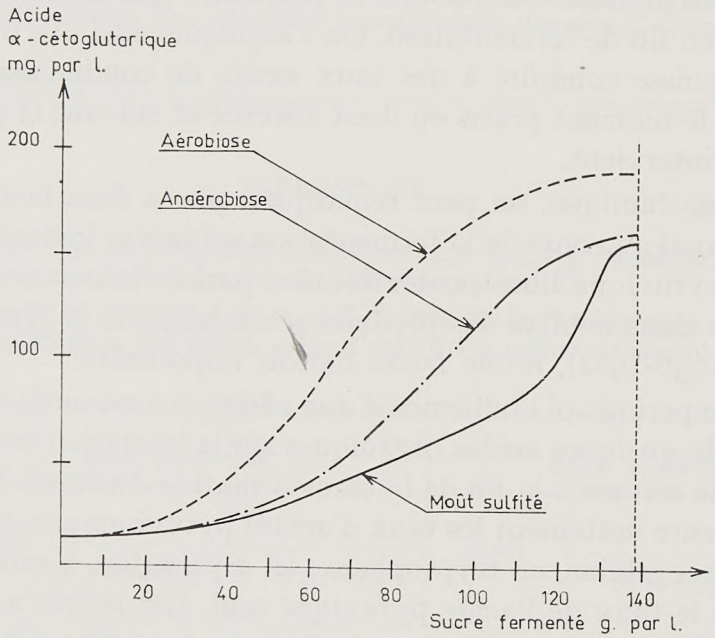


FIG. 20. — *Évolution de la teneur en acide α-cétoglutarique au cours de la fermentation d'un moût de raisin en fonction du sucre fermenté.*

sa teneur a tendance à augmenter au cours de la fermentation. Il existe donc d'autres voies de formation de l'acide α-cétoglutarique.

TABLEAU 21

Formation d'acides cétoniques par différentes levures

Fermentation en anaérobiose. S = milieu synthétique pH 3,5 à base de saccharose, vitamines et cendres de levures. S + AM = *id* S + 5 g par l d'acide DL malique. Moût naturel enrichi en sucre.

	N° de la souche	Acide pyruvique (mg par l)			Acide α-cétoglutarique (mg par l)		
		S	S+AM	Moût	S	S+AM	Moût
Témoin non fermenté		0	0	66	0	0	6
Saccharomyces ellipsoideus	19 E 1	70	102	146	6	8	30
Schizo. acidodevoratus	187	70	82	34	13	26	52
Schizo. liquefaciens	191	258	323	327	9	24	72
Schizo. pombe	193	228	186	186	18	14	64
Schizo. pombe	206	280	200	393	7	8	60

Par ailleurs nous avons remarqué que certaines levures ont un pouvoir cétogène particulièrement élevé (tabl. 21). Les *Schizosaccharomyces* sont rares dans les moûts naturels, mais leurs propriétés peuvent se retrouver chez d'autres souches plus fréquentes.

Par contre, sur le plan pratique, nous n'avons guère rencontré de techniques permettant de modifier les taux d'acides cétoniques formés au cours de la fermentation, qu'il s'agisse de techniques de vinification : intensité du pressurage, de la macération, présence de rafles, etc. ou de conditions particulières de fermentation. Seul le chauffage des moûts avant fermentation diminue sensiblement la teneur en acides cétoniques des vins obtenus et permet quelque espoir d'arriver à les contrôler (tabl. 22). Il existe donc dans les moûts des substances thermolabiles ayant une action importante sur le métabolisme de la fermentation.

TABLEAU 22

Influence du chauffage du moût sur les taux d'acides cétoniques des vins ensemencés par un levain naturel à base de S. oviformis

(Teneurs en mg par litre)

	Acide pyruvique		Acide α-cétoglutarique	
	Moût	Vin	Moût	Vin
Pas de chauffage	9	107	3	204
Chauffage à 50°C	8	51	1	186
Chauffage à 70°C	8	40	1	147

3. *Élimination des acides cétoniques*

Nous avons vu (p. 244) que l'on pouvait diminuer le pouvoir de combinaison d'un vin vis-à-vis de l'anhydride sulfureux en le mutant avec un échangeur d'anions, régénéré sous forme sulfite ou bisulfite. Le tableau 23 montre que ce phénomène est lié, au moins partiellement, à une certaine fixation d'acides cétoniques. L'acide α-cétoglutarique est fixé dans des proportions plus importantes car il est moins combiné à l'anhydride sulfureux que l'acide pyruvique. Cette utilisation des échangeurs d'anions ouvre des possibilités, au moins théoriques, pour le traitement des vins combinant beaucoup d'anhydride sulfureux, soit par fixation spécifique des fonctions carbonyles, soit, plus simplement peut-être, par fixation des acides hydroxysulfoniques résultant de la combinaison sulfitique. KIELHOFER (1963) a signalé cette dernière possibilité et ses inconvénients organoleptiques. L'emploi de résines correctement tamponnées ou chargées d'ions volatils (carbonates par exemple) peut éviter certains écueils. Si une solution technologique de ce problème est possible dans cette voie, il n'est pas certain qu'elle soit souhaitable sur le plan organoleptique ou hygiénique ; cette question déborde du reste le cadre de notre sujet.

TABLEAU 23

Exemples de fixation des acides cétoniques par les échangeurs d'ions sous forme sulfite et bisulfite

Traitement par agitation de l'échangeur dans le vin. Les teneurs en acides cétoniques sont en mg par litre.

Nature de l'échangeur	Poids d'échangeurs (g par l)	Acide pyruvique	Acide α-cétoglutarique
1. Témoin	—	30	75
Dowex 1 × 4 (base forte)	50	12	0
Amberlite IR-45 (base faible)	50	19	29
Lewatit M 500 (base forte)	50	11	0
Lewatit MI (base faible)	50	9	0
2. Témoin	—	119	143
Lewatit MP 60 (base moyenne)	6	117	107
Lewatit M 500 (base forte)	6	119	118
Lewatit MP 500 (base forte)	6	118	136
Lewatit MI (base faible)	6	114	97
3. Témoin	—	139	92
Lewatit MP 60 (base moyenne)	6	110	65
Lewatit M 500 (base forte)	6	116	69
Lewatit MP 500 (base forte)	6	118	73
Lewatit MI (base faible)	2	120	73
	3	118	72

4. *Cas de l'acide glyoxylique*

L'acide glyoxylique existe en faible quantité dans la quasi-totalité des moûts et des raisins peu mûrs (fig. 21) ; sa teneur décroît au cours de la maturation du raisin et augmente légèrement sous l'influence de la pourriture (tabl. 24).

D'autre part on observe toujours une diminution d'environ 50 p. 100 de la teneur en acide glyoxylique au cours de la fermentation, lorsqu'on passe du moût au vin correspondant, sans influence de sulfitage.

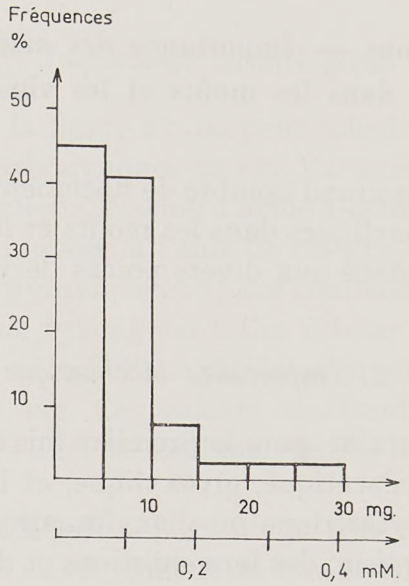


FIG. 21. — *Fréquence des teneurs des moûts et des vins en acide glyoxylique* (43 échantillons analysés).

Enfin, remarquons que l'acide glyoxylique des vins ne doit vraisemblablement pas provenir de l'oxydation de l'acide tartrique. Nous n'avons trouvé que 4 mg d'acide glyoxylique par litre dans un vin de Jerez type *fino* et dans un vin de Banyuls et 9 mg seulement dans un vin blanc de Bordeaux, conservé à l'air pendant 30 mois. Ces trois vins avaient subi une intense oxydation mais sans accumulation d'acide glyoxylique. Dans les vins l'acide tartrique est, contrairement à ce qui se passe en

TABLEAU 24

Évolution du taux d'acide glyoxylique du moût en fonction de la date de récolte

Il y a eu un début de pourriture sur *Sémillon* à partir du 10 octobre 1962.
Les teneurs en acide glyoxylique sont en mg par litre et les teneurs en sucres en g par litre.

Dates de récolte	*Sémillon*		*Ugni blanc*	
	Acide glyoxylique	Sucres	Acide glyoxylique	Sucres
15 septembre	9	114	22	94
22 septembre	9	114	19	104
29 septembre	8	122	17	107
7 octobre	5	145	13	114
12 octobre	7	161	—	—
22 octobre	—	—	5	141

solutions synthétiques, très peu oxydable car il est vraisemblablement protégé par de nombreuses substances nettement plus oxydables que lui.

IV — Conclusions — Importance des acides carbonyliques dans les moûts et les vins

Connaissant par un très grand nombre de documents analytiques la nature et la variabilité des acides carbonyliques dans les moûts et les vins, nous pouvons maintenant en préciser l'importance aux divers points de vue qui nous préoccupent.

1. *Importance biochimique*

La mise en évidence certaine, pour la première fois en œnologie, des acides pyruvique, α-cétoglutarique, oxalacétique, glyoxylique, et l'existence vraisemblable des acides acétylacétique, dioxytartrique ou dioxyfumarique enrichissent nos connaissances sur la biochimie du raisin, des fermentations et du vin. Ces observations nouvelles seront le point de départ de recherches nouvelles.

2. *Importance analytique*

Par la mise au point de méthodes analytiques nouvelles, au moins en œnologie (dosages enzymatiques, chromatrographie des dinitrophénylhydrazones sur couches minces), nous avons complété la liste des corps existant dans les moûts et les vins.

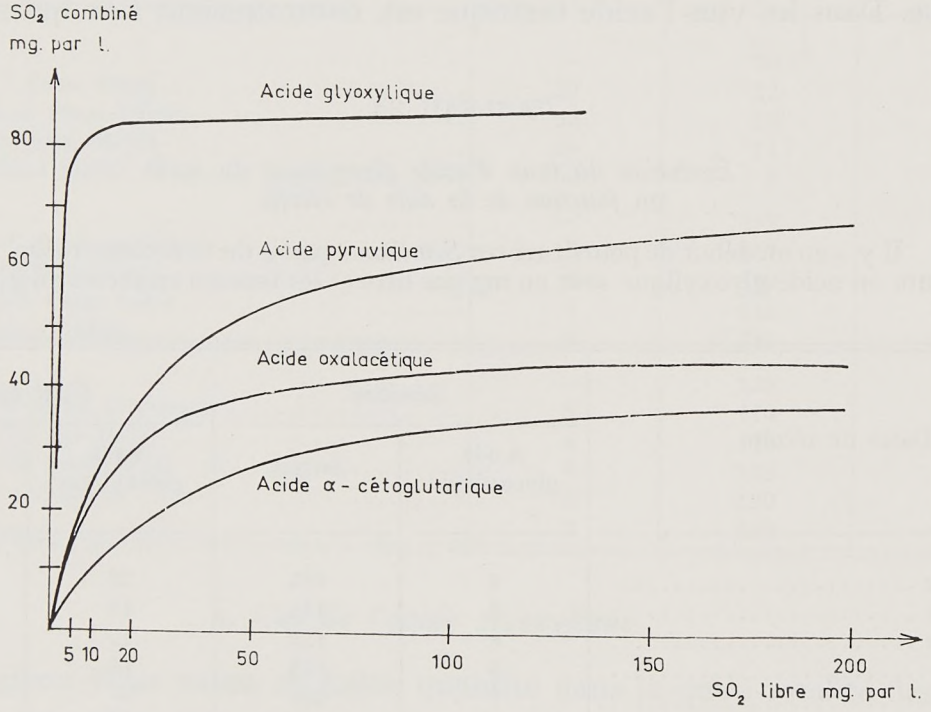


FIG. 22. — *Courbes de combinaison de l'anhydride sulfureux par les acides carbonyliques à la concentration de 100 mg par litre.*

Désormais on devra tenir compte de la présence des acides pyruvique et α-cétoglutarique dans les bilans des produits secondaires de la fermentation et même dans certains bilans des anions. Il en sera sûrement de même pour d'autres acides cétoniques non encore identifiés mais qui paraissent abondants.

3. *Importance technologique*

A l'aide des courbes de la figure 22, on peut calculer aisément l'anhydride sulfureux combiné aux acides carbonyliques du vin. Par exemple dans un vin contenant par litre 200 mg d'acide pyruvique, 100 mg d'acide α-cétoglutarique et 50 mg d'anhydride sulfureux libre, nous trouvons à l'aide de ces graphiques 104 mg d'anhydride sulfureux combinés à l'acide pyruvique et 27 mg combinés à l'acide α-cétoglutarique, soit un total très important de 131 mg par l. Ces valeurs seraient respectivement 76, 17 et 93 mg en présence de 20 mg d'anhydride sulfureux libre par litre et 123, 34 et 158 mg en présence de 100 mg. Ces valeurs montrent bien l'importance du rôle joué par les acides cétoniques dans la combinaison de l'anhydride sulfureux dans les vins.

Cette combinaison est à la fois importante et très variable selon les conditions. Les acides cétoniques, à dose élevée, jouent un rôle essentiel dans la fixation du SO_2 apporté à un vin biologiquement stable et expliquent de nombreux cas de combinaison anormale. On conçoit tout l'intérêt qu'il y aurait à réduire les taux d'acides cétoniques dans les vins, soit en défavorisant leur formation en agissant par exemple sur les conditions de la maturation du raisin ou sur les conditions de fermentation, soit, s'il était possible, en les éliminant des vins où ils sont abondants.

CHAPITRE V

LES COMPOSÉS CARBONYLÉS NEUTRES DES VINS

On sait que tous les vins contiennent de l'éthanal et des traces de diacétyle et d'acétoïne mais on n'a pas beaucoup de documents sur les autres aldéhydes et cétones éventuellement présents. L'utilisation de la chromatographie des dinitrophénylhydrazones sur couches minces nous a permis l'étude de ces substances, qui se montrent assez nombreuses. Certains de nos résultats ont été confirmés par Boidron (1966), à la Station de Bordeaux, à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse.

I — Identification des composés carbonylés neutres

Pour la facilité de l'exposé, nous divisons l'examen de nos résultats en trois parties.

1. *Aldéhyde glycolique, aldéhyde glycérique, dihydroxyacétone*

Les figures 23, 24 et 25 représentant des chromatogrammes simplifiés des dinitrophénylhydrazones de composés carbonylés. Elles comparent celles de substances connues avec celles obtenues à partir de vins. En utilisant le solvant n° 1 (benzène-éther de pétrole-acétate d'éthyle), on conclut à la présence certaine d'aldéhyde glycolique et à la présence possible d'aldéhyde glycérique ou de dihydroxyacétone ; le spot supérieur de la dihydroxyacétone est en effet masqué par d'autres spots non représentés ici. Le solvant n° 2 (hexane — acétate d'isoamyle — éther) fait aboutir aux mêmes conclusions. D'un autre côté, le dosage enzymatique spécifique confirme la présence de faibles doses de dihydroxyacétone (0,5 à 5 mg par l environ) dans les vins et les moûts en fermentation.

Ce dosage enzymatique et les résultats de la chromatographie permettent de tirer les conclusions suivantes : tous les vins examinés contiennent de l'aldéhyde glycolique ainsi que de faibles quantités de dihydroxyacétone, mais on ne peut conclure avec certitude quant à la présence d'aldéhyde glycérique.

Sachant que les acides glycolique (G. Ribéreau-Gayon, 1964) et glyoxylique ont été caractérisés dans les raisins et les vins, on comprend aisément la présence d'aldéhyde glycolique, déjà signalé par Baraud (1954) à la dose de 0,1 à 0,2 mM par litre

L'aldéhyde glycérique et le dihydroxyacétone sont, sous forme d'esters phosphoriques, des intermédiaires importants de la fermentation alcoolique. Kiessling

(1949) a pu en doser dans un moût en fermentation jusqu'à 3 et 4 mM par l. Réputés très instables, particulièrement l'aldéhyde phosphoglycérique qui est oxydé en acide phosphoglycérique, ces corps peuvent être relativement protégés dans les moûts par leur combinaison avec l'anhydride sulfureux.

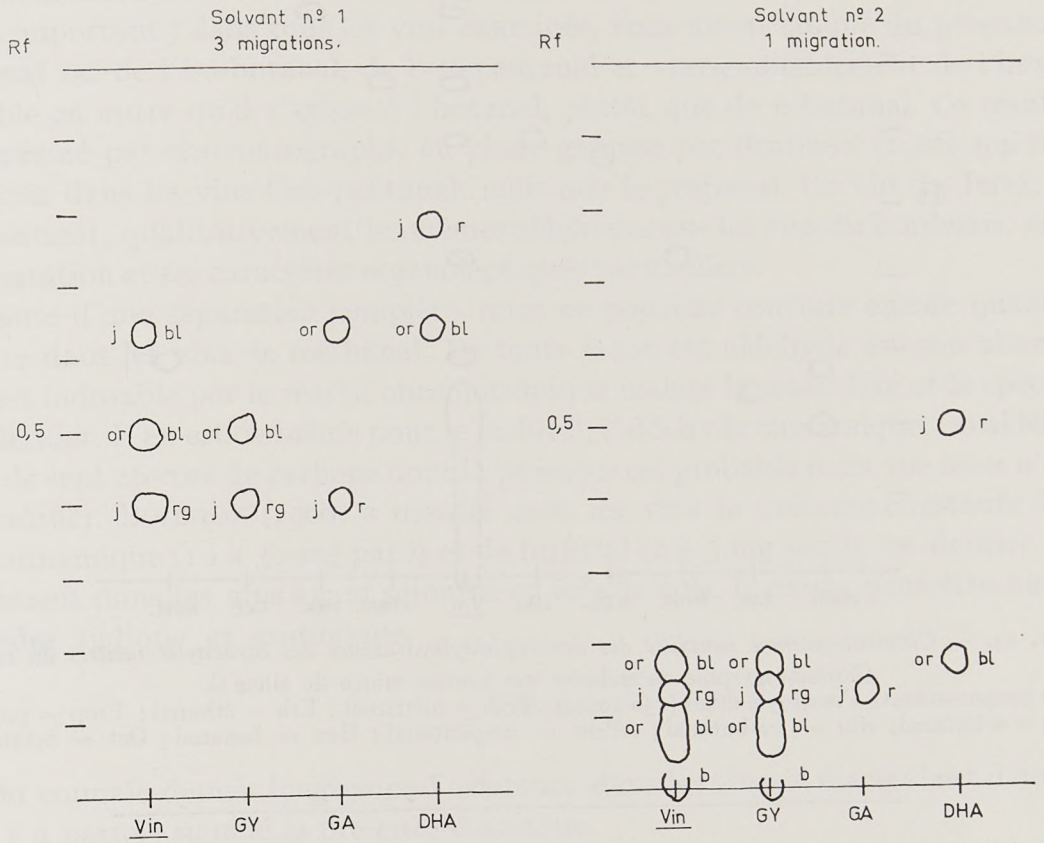


FIG. 23. — *Chromatogramme simplifié des dinitrophénylhydrazones des carbonyles neutres du vin.* Chromatographie ascendante sur couche mince de silice G.

Solvant 1 : benzène-éther de pétrole-acétate d'éthyle (170-25-5).
Solvant 2 : hexane-acétate d'isoamyle-éther (150-30-5).
On a indiqué à gauche des spots, en abrégé, la couleur avant révélation et à droite, la couleur après révélation à la soude.
j = jaune ; r = rouge ; rg = rouge groseille ; bl = bleu ; b = brun ; GY = aldéhyde glycolique ; GA = aldéhyde glycérique ; DHA = dihydroxyacétone.

Les identifications chromatographiques ont été faites par comparaison avec plusieurs substances témoins d'origines différentes, afin d'exclure la possibilité d'identification à des artefacts ou à des dérivés des substances envisagées. Dans tous les cas, nous avons observé les mêmes spots, avec les mêmes Rf et avec les mêmes colorations avant et après révélation à la soude.

2. *Aldéhydes aliphatiques et aromatiques*

Plusieurs auteurs ont signalé, dans un nombre toujours restreint de vins, la présence d'alcools et d'acides aliphatiques droits ou ramifiés de C_1 à C_{10} dans les vins, et jusqu'en C_{18} dans la levure et les lies de vin, et la présence d'aldéhydes aliphatiques jusqu'en C_7, ainsi que de furfural et d'aldéhyde cinnamique, dans les vins et les eaux-de-vie de vins (HENNIG, 1943 ; BARAUD, 1962 ; WEBB et coll., 1963, 1964 ; SUOMALAINEN et RONKAINEN, 1963). On connaît également dans les vins la présence de

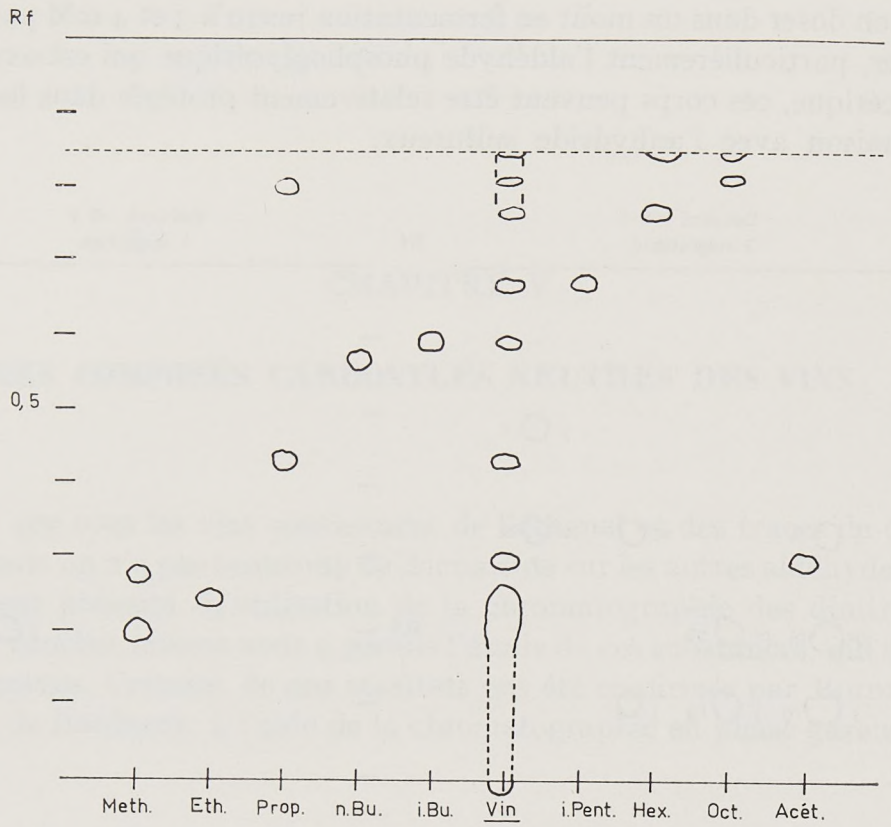


FIG. 24. — *Chromatogramme simplifié des dinitrophénylhydrazones des carbonyles neutres du vin.*
Chromatographie ascendante sur couche mince de silice G.
Solvant : hexane-acétate d'isoamyle-éther (150-20-20). Meth = méthanal ; Eth = éthanal ; Prop = propanal; *n*Bu = *n*-butanal; *i*Bu = *iso*-butanal ; *i*.Pent = *iso*-pentanal ; Hex = hexanal ; Oct = octanal.

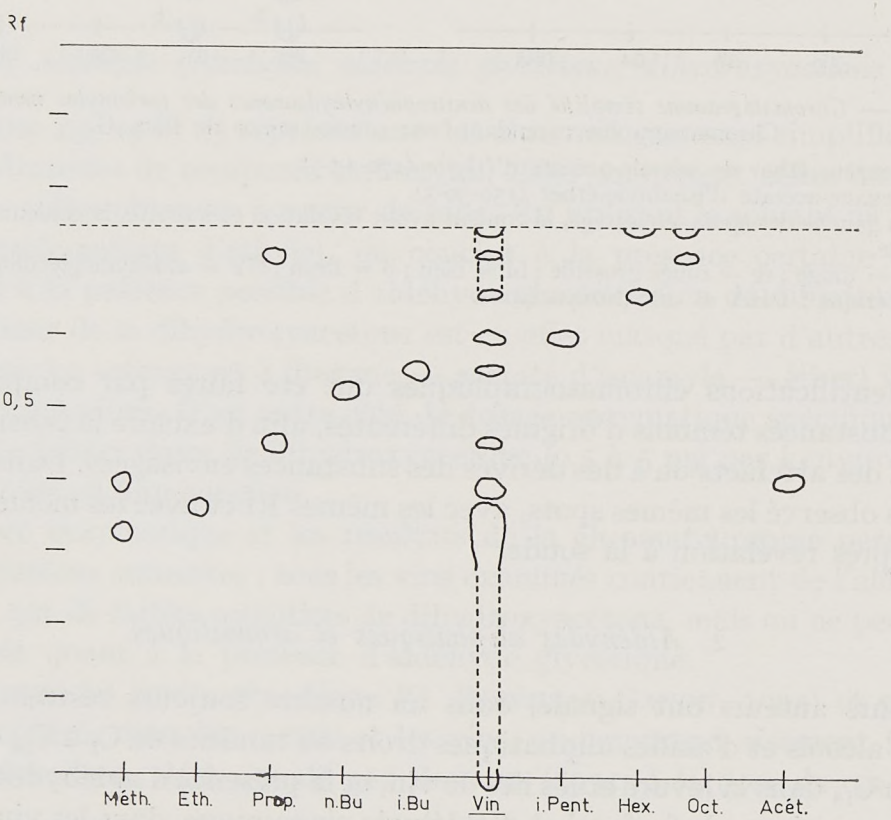


FIG. 25. — *Chromatogramme simplifié des dinitrophénylhydrazones des carbonyles neutres du vin.*
Chromatographie ascendante sur couche mince de silice G.
Solvant : benzène — éther de pétrole — acétate d'éthyle (40-60-1) ; deux migrations successives.

plusieurs acides-phénols (GUIMBERTEAU et PORTAL, 1961 ; P. RIBÉREAU-GAYON, 1964).

Nous avons recherché les aldéhydes aliphatiques de C_1 à C_9, le furfural et l'aldéhyde cinnamique dans plusieurs vins d'origine différente. Nous avons pu dégager les conclusions suivantes : dans tous les vins l'éthanal est, souvent de beaucoup, l'aldéhyde le plus important ; dans tous les vins examinés, nous avons trouvé du propanal, du *n*-butanal ou de l'*iso*-butanal, de l'*iso*-pentanal et vraisemblablement de l'hexanal. Il semble en outre qu'il s'agisse d'*i*-butanal, plutôt que de *n*-butanal. Ce résultat a été confirmé par chromatographie en phase gazeuse par BOIDRON (1966) qui trouve également dans les vins l'*iso*-pentanal, mais non le propanal. Un vin de Jerez, type *fino*, contient, qualitativement les mêmes aldéhydes que les vins du Bordelais, malgré sa préparation et ses caractères organoleptiques particuliers.

Faute d'une séparation complète, nous ne pouvons conclure encore quant à la présence dans les vins de méthanal. De toute façon cet aldéhyde est peu abondant, car il est indosable par le réactif chromotropique malgré la sensibilité et la spécificité de ce dernier. Il en est de même pour le furfural, l'aldéhyde cinnamique, les aldéhydes à plus de sept atomes de carbone dont la présence est probable mais que nous n'avons pu identifier. BOIDRON (1966) a montré dans les vins la présence constante d'aldéhyde cinnamique (10 à 30 mg par l) et de furfural (2 à 3 mg par l), ce dernier particulièrement dans les vins ayant séjourné en fûts de bois. Il existe peut-être aussi les aldéhydes tiglique et crotonique.

3. *Cétones*

On connaît depuis longtemps l'existence dans les vins de diacétyle et d'acétoïne et on y a parfois signalé la présence d'acétone.

Par chromatographie des dinitrophénylhydrazones, on vérifie aisément la présence d'acétoïne dans les distillats de vin où il est concentré. De même on peut identifier la présence assez abondante d'acétone, en opérant directement dans les vins. Cette présence a été confirmée par BOIDRON (1966), qui a identifié en outre l'octanone-3 dans un vin rouge de Merlot.

II — Importance des aldéhydes et cétones dans les vins

La confirmation de la présence des aldéhydes glycolique et glycérique, de la dihydroxyacétone dans les vins a un intérêt biochimique certain, particulièrement dans l'étude des fermentations. La figure 26 montre le pouvoir de combinaison de ces corps vis-à-vis de l'anhydride sulfureux et donc l'importance de leur rôle, qu'ils se trouvent sous forme libre ou sous forme d'esters phosphoriques. La technique utilisée ici ne permet pas de préciser leur estérification éventuelle, ni leurs teneurs approximatives (sauf pour la dihydroxyacétone) ; elle constitue une base pour des recherches plus précises.

La mise en évidence dans les vins d'aldéhydes supérieurs (propanal, *i*-butanal, *i*-pentanal, hexanal) et d'aldéhyde cinnamique ne saurait surprendre, ces aldéhydes pouvant dériver des alcools et acides correspondants par réduction enzymatique

(réaction I) ou par dismutation (réaction II) ; par ailleurs ces aldéhydes peuvent être stabilisés par combinaison à l'anhydride sulfureux (réaction III).

alcooldéshydrogénase (ADH)

(I) $R—CHO + NAD—H + H^+ \rightleftharpoons R—CH_2OH + NAD^+$

(II) $2\,R—CHO + H_2O \rightleftharpoons R—CH_2OH + R—COOH$

(III) $R—CHO + H_2SO_3 \rightleftharpoons R—CHOH — SO_3H$

L'équilibre de ces réactions varie selon les conditions d'aération, de sulfitage et certainement de composition initiale du milieu (Genevois, 1962) et il en est de même des teneurs des différents aldéhydes. Ces variations sont importantes dans l'étude de la biochimie du vin et certainement aussi dans l'étude de la composition de l'arôme des vins car ces aldéhydes ont tous une odeur caractéristique mais ces

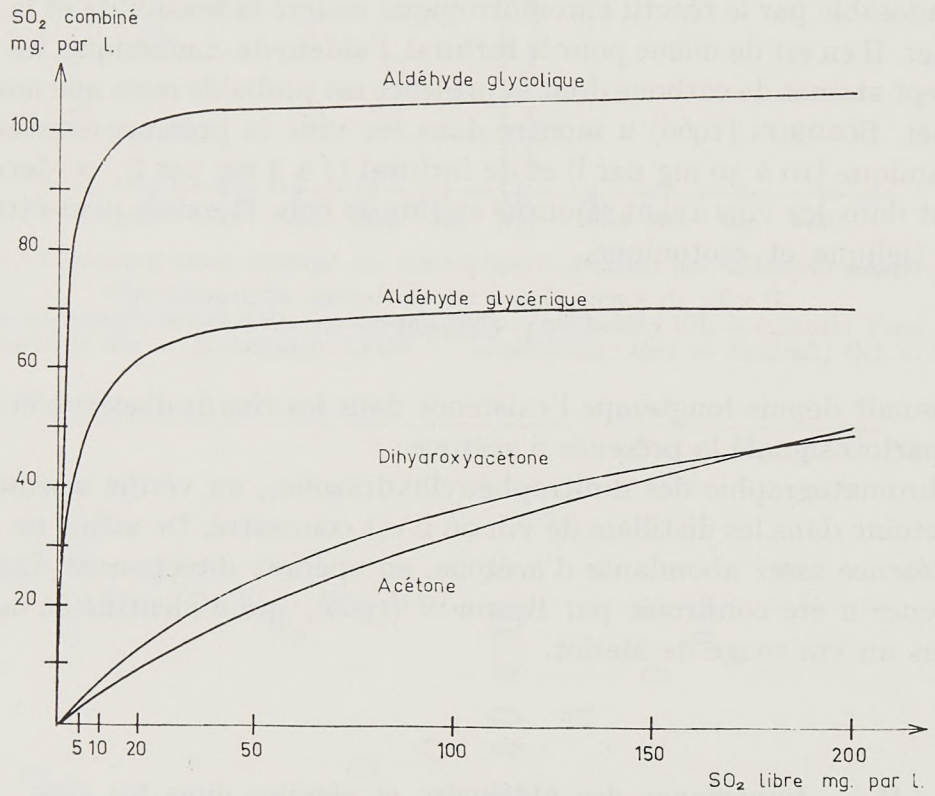


Fig. 26. — *Courbes de combinaison de l'anhydride sulfureux par différents aldéhydes et cétones des moûts et des vins à la concentration de 100 mg par l*

observations ne modifient pas nos connaissances sur la combinaison globale de l'anhydride sulfureux aux aldéhydes car leur combinaison est pratiquement totale et ils sont dosés comme éthanal par la méthode Jaulmes-Espezel. La présence générale d'acétone dans les vins, à dose relativement élevée puisqu'elle peut atteindre le quart de la teneur en éthanal dans certains vins, est un fait important. Biochimiquement, l'acétone est un dérivé de l'éthanal, puis de l'acide acétyl-acétique, dont la présence dans les vins est ainsi rendue plus plausible.

$2CH_3—CHO \longrightarrow CH_3—CO—CH_2—COOH + H_2O \longrightarrow CH_3—CO—CH_3 + CO_2$

éthanal — acide acétylacétique — acétone

La figure 26 montre que l'acétone des vins est faiblement combiné à l'anhydride sulfureux. Environ 80 p. 100 restent libres dans un vin contenant 50 mg par l d'anhydride sulfureux libre. L'acétone peut jouer alors un rôle important au point de vue organoleptique comme constituant de l'arôme des vins. D'un autre côté, cette faible combinaison de l'acétone modifie nos connaissances sur l'anhydride sulfureux combiné à l'éthanal. En effet, l'acétone des vins est dosé comme éthanal car il est très volatil et est totalement combiné par le sulfite de sodium assez concentré à pH 7,0. Ainsi par exemple, 25 mg par l d'acétone sont comptés comme $\frac{25 \times 44}{58} = 19$ mg d'éthanal, fixant 28 mg d'anhydride sulfureux alors que dans le vin ils en fixent seulement $\frac{20 \times 25}{100} = 5$ mg environ pour 50 mg par l d'anhydride sulfureux libre. Il en résulte une erreur par excès de 23 mg par l ou plus simplement, un excès calculé d'environ 1 mg d'anhydride sulfureux combiné par mg d'acétone. L'étude précise des teneurs des vins en acétone serait donc très intéressante à poursuivre pour le dégustateur et le technicien.

Conclusions

L'étude rapide de nombreux échantillons de vins, rendue possible par la chromatographie sur couches minces des dinitrophénylhydrazones, nous a permis de préciser nos connaissances sur les aldéhydes et les cétones des vins. La chromatographie en phase gazeuse, appliquée parallèlement par Boidron (1966) ,a permis plusieurs confirmations.

Les vins contiennent de l'aldéhyde glycolique, des traces de dihydroxyacétone et peut-être aussi de l'aldéhyde glycérique. Parmi les aldéhydes volatils, outre l'éthanal bien connu, nous avons démontré la présence de propanal, d'*i*-butanal, d'*i*-pentanal et sans doute d'hexanal, ainsi que d'autres aldéhydes supérieurs. L'aldéhyde cinnamique et le furfural n'ont pas été identifiés avec certitude. Enfin tous les vins examinés contiennent de l'acétone en quantité notable.

Pratiquement, ces mises en évidence ou ces confirmations, outre leur intérêt biochimique, modifient nos connaissances des combinaisons de l'anhydride sulfureux et des constituants de l'arôme des vins. Les aldéhydes supérieurs sont complétement combinés à l'anhydride sulfureux dans les vins et y sont comptés comme éthanal. Quant à l'acétone, qui n'est que partiellement combiné, sa présence fait surestimer l'anhydride sulfureux combiné à l'éthanal et doit intervenir dans l'arôme des vins. Ces résultats qualitatifs nouveaux restent cependant à préciser.

CHAPITRE VI

LES ACIDES URONIQUES DANS LES MOÛTS ET LES VINS

CHOUCHAK (1928), puis VENTRE (1939) ont signalé la présence d'acide glucuronique dans les moûts et les vins issus de raisins pourris. La présence d'acide galacturonique, provenant de l'hydrolyse des pectines du raisin est couramment admise. Plus récemment RENTSCHLER et TANNER (1955) ont bien confirmé cette idée que tous les vins contiennent de l'acide galacturonique et que les vins issus de raisins altérés (pourriture, vers de la grappe) contiennent en outre de l'acide glucuronique.

Nous avons repris ces travaux après la mise au point de méthodes qualitatives et quantitatives convenables et, comme nous l'avons déjà signalé (BLOUIN et PEYNAUD, 1963), nous avons constaté la présence simultanée des acides glucuronique et galacturonique dans la quasi-totalité des moûts et des vins examinés (une centaine environ). Nos manipulations étaient terminées depuis quelques mois, lorsque nous eûmes connaissance des résultats de GENTILINI et coll. (1963), qui confirmaient la présence d'acide glucuronique dans les vins italiens de Recioto, et des résultats de DIMITAKI-KOURAKOU (1964), complétant des travaux déjà publiés (GEORGEAKOPOULOS et coll., 1963) concluant nettement à l'absence de ce même acide glucuronique dans les vins grecs et le vin de Sauternes examinés.

Ne pouvant matériellement comparer les différentes méthodes proposées, il nous paraît cependant utile d'expliciter nos travaux et nos résultats, afin de justifier les conclusions qu'ils nous ont amenées à faire.

I — Présence des acides uroniques dans les moûts et les vins

On admet donc unanimement la présence d'acide galacturonique dans les moûts et les vins mais non celle d'acide glucuronique. Avant l'utilisation de la chromatographie il était en effet difficile, voire impossible, de les séparer l'un de l'autre ; le spot des acides uroniques était considéré comme de l'acide galacturonique, que l'on savait provenir des matières pectiques. Nous pouvons montrer que ces deux acides uroniques existent simultanément dans les vins normaux, en utilisant plusieurs études de principes variés : chromatographie, dosage colorimétrique différentiel, présence de dérivés identifiés.

1. *Études chromatographiques*

La chromatographie sur papier à l'aide du solvant isopropanol-pyridine-eau-acide acétique permet une séparation approximative permettant de conclure à la

présence simultanée des deux acides lorsqu'ils sont présents en solution en quantités équivalentes (fig. 27). La grande majorité des échantillons examinés montre nettement une tache correspondant à un spot d'acide uronique (révélé en bleu sur fond blanc virant au rose par le naphtorésorcinol), au-dessus du spot de l'acide galacturonique et au niveau du spot témoin de l'acide glucuronique. Le doute n'est permis qu'en cas d'un large excès d'acide galacturonique masquant l'autre tache. L'estimation semi-quantitative par comparaison des spots est alors très aléatoire. Le vin n° 1 contient 400 mg d'acide galacturonique et 200 mg d'acide glucuronique dosés colorimétriquement ; les teneurs du vin n° 2 sont respectivement 500 mg et 50 mg.

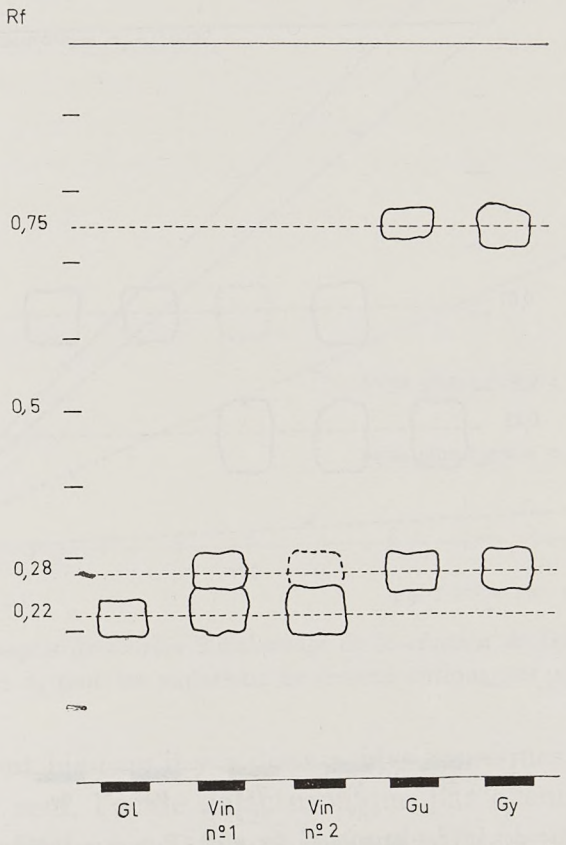


FIG. 27. — *Chromatographie des acides uroniques des vins. Papier Whatman n° 4.*
Solvant : isopropanol-pyridine-eau-acide acétique (8-8-4-1).
Gl = acide galacturonique ; Gu = acide glucuronique ; Gy = glucurone.

Nous nous trouvons ici en opposition avec GEORGEAKOPOULOS et coll. mais nous remarquons que cette intéressante étude concerne un nombre réduit de vins grecs et un seul vin français. D'autre part la séparation n'a été effectuée que sur colonne d'échangeurs d'ions et, précisément dans le vin de Sauternes étudié, les auteurs trouvent un acide non identifié dans la fraction d'éluat correspondant habituellement à l'acide glucuronique ; cet acide inconnu est révélé en jaune, tandis que l'acide glucuronique est révélé en brun. Il pourrait s'agir de traces d'acide glucuronique imparfaitement révélées ; la révélation par l'aniline est en effet peu sensible et le trempage est un procédé complexe, habituellement abandonné au profit de la pulvérisation qui supprime le lavage et la formation de traînées. L'absence d'acide glucuronique dans les vins grecs ne prouve d'ailleurs pas son absence dans tous les types de vins. Plus récemment DIMOTAKI-KOURAKOU (1964) a étendu ses conclusions

à tous les vins, après avoir utilisé une séparation complète des acides glucuronique et galacturonique par lactonisation de l'acide glucuronique de diverses façons. Nous avons nous-même déjà réalisé cette séparation complète des deux acides (chap. III).

D'autre part, à l'aide de la chromatographie sur papier échangeur d'ions Amberlite SA-2, on peut séparer parfaitement les acides glucuronique et galacturonique et les identifier facilement parmi les acides du vin à l'aide d'une révélation spécifique (fig. 28). La séparation est toujours bonne, que les deux acides uroniques soient présents en quantités équivalentes (vin n° 1) ou qu'il y ait un large excès d'acide galacturonique (vin n° 2) ; l'estimation semi-quantitative est toujours possible.

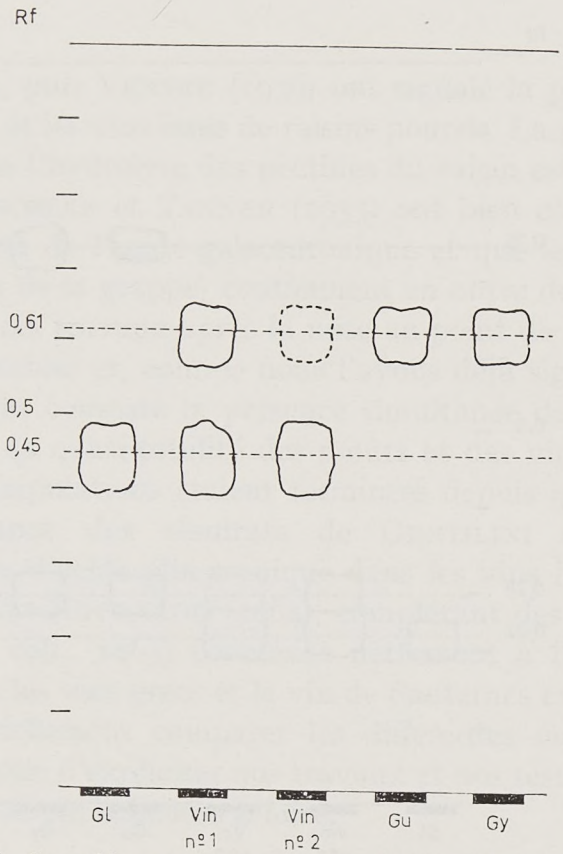


FIG. 28. — *Chromatographie des acides uroniques des vins. Papier échangeurs d'ions Amberlite SA-2*
Solvant : métanol 50° saturé par le sulfite de sodium.

En résumé, deux techniques chromatographiques différentes nous ont montré la présence quasi constante d'acide glucuronique et d'acide galacturonique dans les dizaines de moûts et de vins blancs ou rouges du Bordelais ou du Languedoc que nous avons examinés. Ces résultats sont en contradiction avec ceux de DIMOTAKI-KOURAKOU qui a utilisé des techniques de recherche différentes, appliquées à des vins différents.

2. *Étude colorimétrique quantitative*

Sans reprendre ce qui a déjà été dit (p. 276) rappelons que dans le dosage des acides uroniques par la méthode de DISCHE modifiée, l'acide glucuronique réagit beaucoup moins vite que l'acide galacturonique ; en étudiant deux prises d'essais d'un même échantillon après deux temps de réaction différents, on peut déterminer séparément chaque acide.

Le graphique 29 montre les courbes d'étalonnage obtenues au cours d'un dosage et indique les pentes de ces courbes, c'est-à-dire les variations de densité optique du milieu par µg d'acide uronique dans la prise d'essai. Pour le vin n° 1, nous avons obtenu les résultats suivants :

Densité optique après chauffage de 1 mn, $DO_1 = 0{,}068$
Densité optique après chauffage de 15 mn, $DO_2 = 0{,}215$

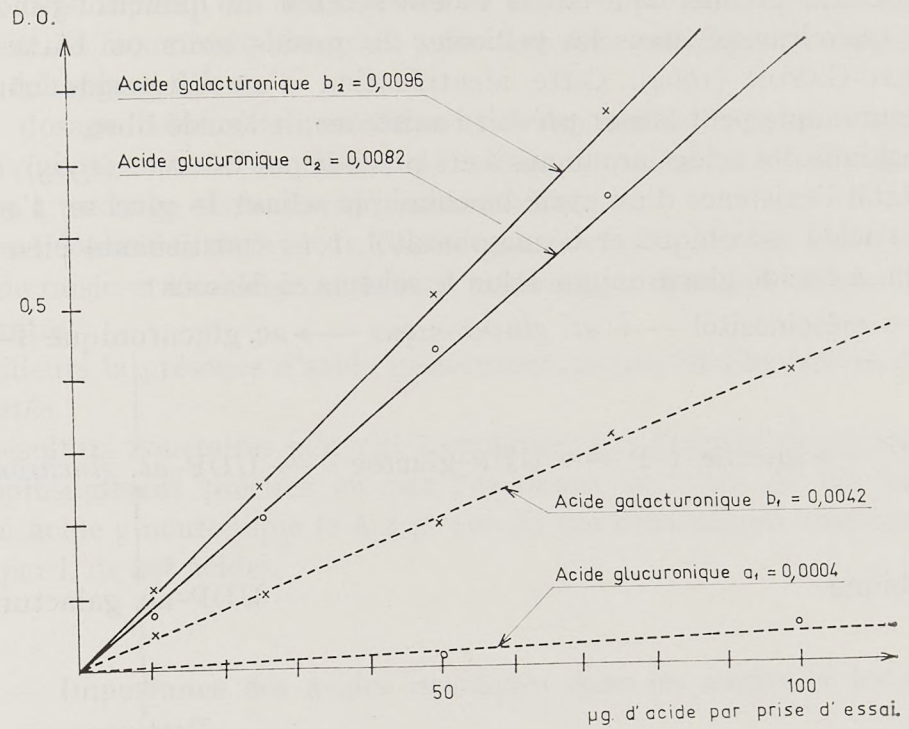


FIG. 29. — *Exemples de courbes d'étalonnage de la réaction de* DISCHE *modifiée* (a_1, b_1, a_2, et b_2 sont les variations de densité optique par µg d'acide).

Ces chiffres montrent bien qu'il y a deux acides uroniques dans ce vin. En effet s'il n'y en avait qu'un seul, l'acide galacturonique par exemple, on aurait soit le couple $DO_1 = 0{,}068$ et $DO'_2 = 0{,}155$, soit le couple $DO_1' = 0{,}094$ et $DO_2 = 0{,}215$. S'il n'y avait que de l'acide glucuronique, on aurait : $DO_1 = 0{,}068$ et $DO''_2 = 1{,}39$ ou $DO''_1 = 0{,}011$ et $DO_2 = 0{,}215$. Les résultats expérimentaux étant très éloignés de ces chiffres, on doit conclure à l'existence simultanée d'acide glucuronique et d'acide galacturonique, aux doses respectives de 202 et 385 mg par l.

Cette méthode reste valable pour des vins ayant un large excès d'acide galacturonique. Avec le vin n° 2, nous avons obtenu :

$$DO_1 = 0{,}086$$
$$DO_2 = 0{,}209$$

Avec les hypothèses précédentes, on devrait avoir ici, s'il n'y avait que de l'acide galacturonique, $DO_1 = 0{,}086$ et $DO'_2 = 0{,}196$ ou $DO'_1 = 0{,}092$ et $DO_2 = 0{,}209$; s'il n'y avait que de l'acide glucuronique, $DO_1 = 0{,}086$ et $DO''_2 = 1{,}770$ ou $DO''_1 = 4{,}280$ et $DO_2 = 0{,}209$. Ce vin est donc pauvre en acide glucuronique (41 mg par l pour 510 mg d'acide galacturonique) mais le dosage colorimétrique permet de trancher sans ambiguïté.

à tous les vins, après avoir utilisé une séparation complète des acides glucuronique et galacturonique par lactonisation de l'acide glucuronique de diverses façons. Nous avons nous-même déjà réalisé cette séparation complète des deux acides (chap. III).

D'autre part, à l'aide de la chromatographie sur papier échangeur d'ions Amberlite SA-2, on peut séparer parfaitement les acides glucuronique et galacturonique et les identifier facilement parmi les acides du vin à l'aide d'une révélation spécifique (fig. 28). La séparation est toujours bonne, que les deux acides uroniques soient présents en quantités équivalentes (vin n° 1) ou qu'il y ait un large excès d'acide galacturonique (vin n° 2) ; l'estimation semi-quantitative est toujours possible.

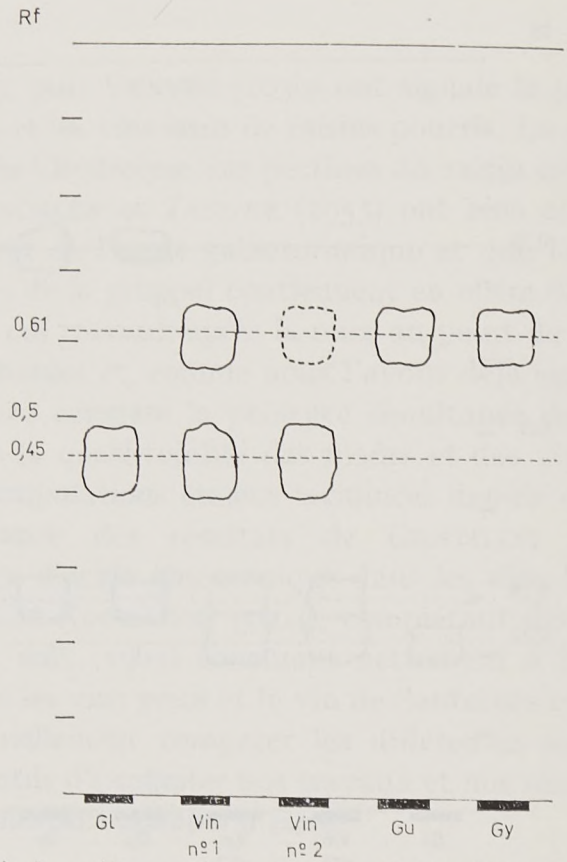


FIG. 28. — *Chromatographie des acides uroniques des vins. Papier échangeurs d'ions Amberlite SA-2* Solvant : métanol 50° saturé par le sulfite de sodium.

En résumé, deux techniques chromatographiques différentes nous ont montré la présence quasi constante d'acide glucuronique et d'acide galacturonique dans les dizaines de moûts et de vins blancs ou rouges du Bordelais ou du Languedoc que nous avons examinés. Ces résultats sont en contradiction avec ceux de DIMOTAKI-KOURAKOU qui a utilisé des techniques de recherche différentes, appliquées à des vins différents.

2. *Étude colorimétrique quantitative*

Sans reprendre ce qui a déjà été dit (p. 276) rappelons que dans le dosage des acides uroniques par la méthode de DISCHE modifiée, l'acide glucuronique réagit beaucoup moins vite que l'acide galacturonique ; en étudiant deux prises d'essais d'un même échantillon après deux temps de réaction différents, on peut déterminer séparément chaque acide.

Le graphique 29 montre les courbes d'étalonnage obtenues au cours d'un dosage et indique les pentes de ces courbes, c'est-à-dire les variations de densité optique du milieu par µg d'acide uronique dans la prise d'essai. Pour le vin n° 1, nous avons obtenu les résultats suivants :

Densité optique après chauffage de 1 mn, $DO_1 = 0{,}068$
Densité optique après chauffage de 15 mn, $DO_2 = 0{,}215$

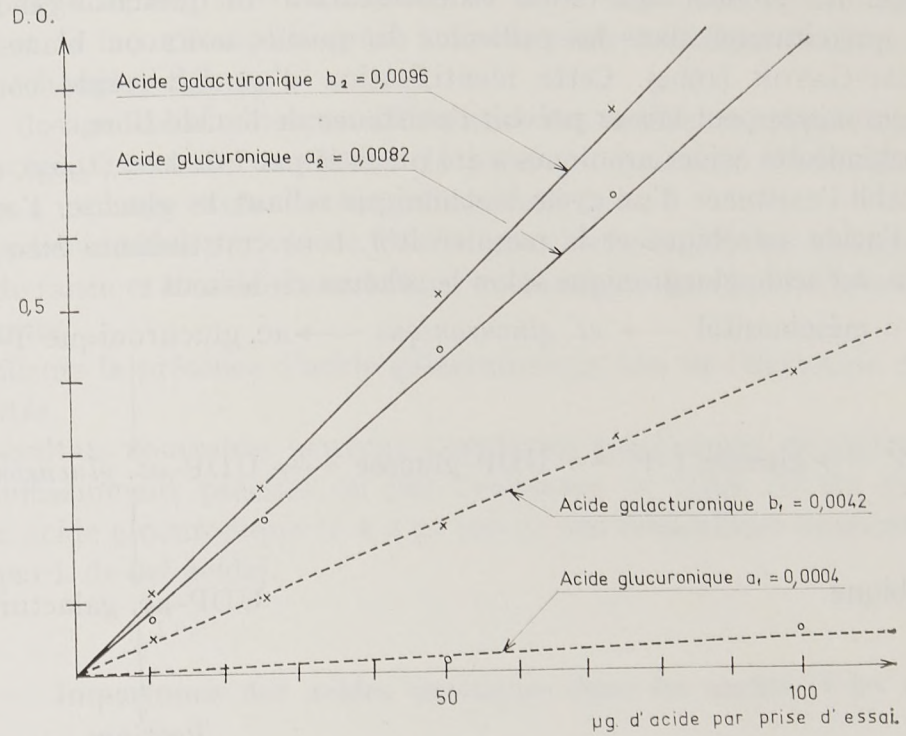


FIG. 29. — *Exemples de courbes d'étalonnage de la réaction de* DISCHE *modifiée* (a_1, b_1, a_2, et b_2 sont les variations de densité optique par µg d'acide).

Ces chiffres montrent bien qu'il y a deux acides uroniques dans ce vin. En effet s'il n'y en avait qu'un seul, l'acide galacturonique par exemple, on aurait soit le couple $DO_1 = 0{,}068$ et $DO'_2 = 0{,}155$, soit le couple $DO_1' = 0{,}094$ et $DO_2 = 0{,}215$. S'il n'y avait que de l'acide glucuronique, on aurait : $DO_1 = 0{,}068$ et $DO''_2 = 1{,}39$ ou $DO''_1 = 0{,}011$ et $DO_2 = 0{,}215$. Les résultats expérimentaux étant très éloignés de ces chiffres, on doit conclure à l'existence simultanée d'acide glucuronique et d'acide galacturonique, aux doses respectives de 202 et 385 mg par l.

Cette méthode reste valable pour des vins ayant un large excès d'acide galacturonique. Avec le vin n° 2, nous avons obtenu :

$$DO_1 = 0{,}086$$
$$DO_2 = 0{,}209$$

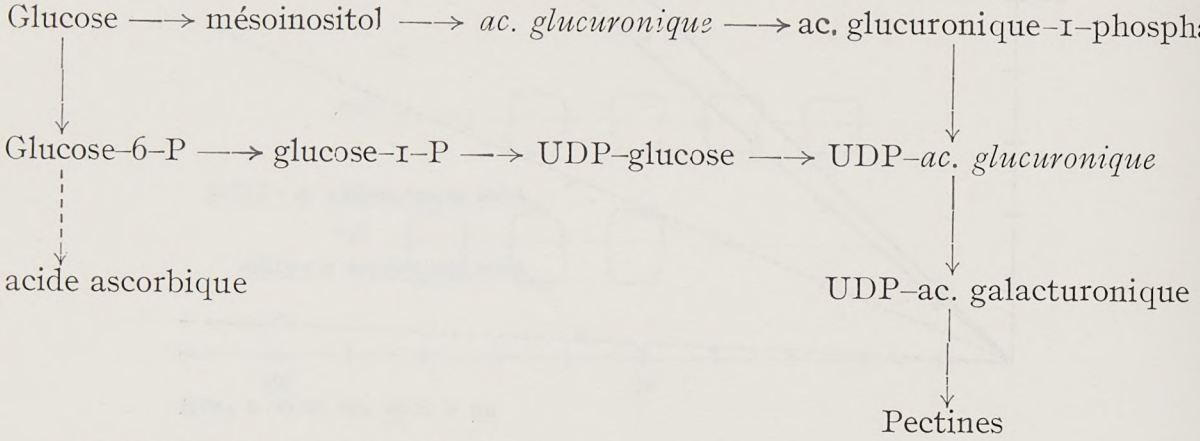
Avec les hypothèses précédentes, on devrait avoir ici, s'il n'y avait que de l'acide galacturonique, $DO_1 = 0{,}086$ et $DO'_2 = 0{,}196$ ou $DO'_1 = 0{,}092$ et $DO_2 = 0{,}209$; s'il n'y avait que de l'acide glucuronique, $DO_1 = 0{,}086$ et $DO''_2 = 1{,}770$ ou $DO''_1 = 4{,}280$ et $DO_2 = 0{,}209$. Ce vin est donc pauvre en acide glucuronique (41 mg par l pour 510 mg d'acide galacturonique) mais le dosage colorimétrique permet de trancher sans ambiguïté.

En résumé, le dosage colorimétrique différentiel des acides uroniques permet de les doser l'un en présence de l'autre et de détecter jusqu'à environ 20 mg par l d'acide glucuronique en présence de 20 à 30 fois plus d'acide galacturonique. Cette technique chimique confirme les résultats obtenus par chromatographie.

3. *Études biochimiques*

D'autres arguments biochimiques militent en faveur de la présence d'acide glucuronique. En premier lieu citons l'identification du quercitol-3-monoglucuronoside (ou querciturone) dans les pellicules de raisins noirs ou blancs faite par P. Ribéreau-Gayon (1964). Cette identification d'un hétéroside contenant de l'acide glucuronique peut laisser prévoir l'existence de l'acide libre.

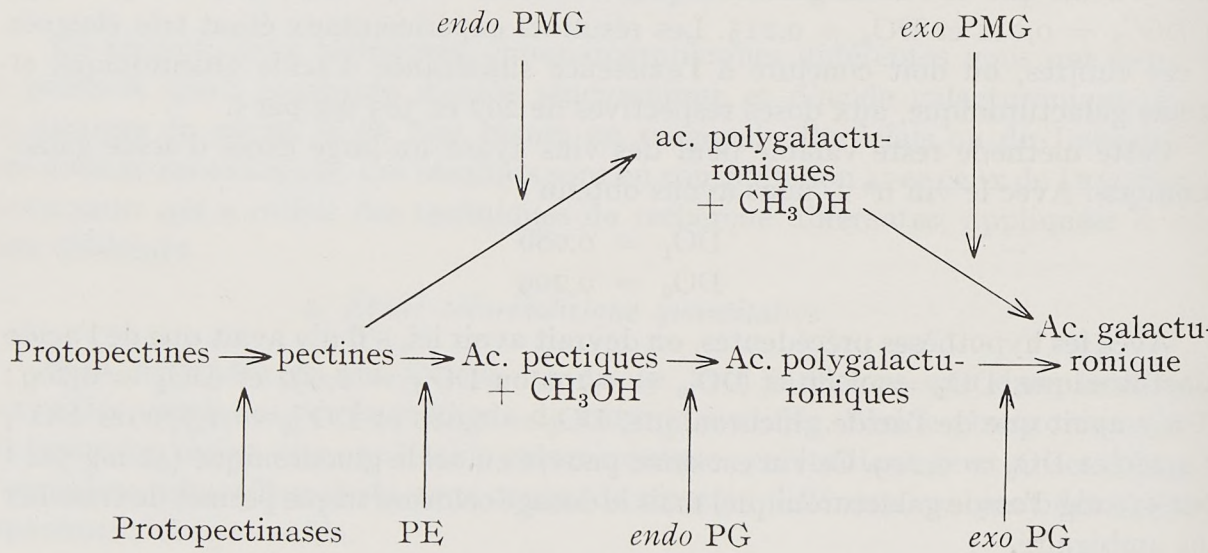
La biochimie des acides uroniques a été précisée par Loewus (1963), qui à l'aide du ^{14}C a établi l'existence d'un cycle biochimique reliant le glucose, l'acide galacturonique, l'acide ascorbique et le mésoinositol, tous constituants bien connus du jus de raisin, à l'acide glucuronique selon le schéma ci-dessous :



UDP = uridinediphosphate.
P = phosphate.

On a reconnu l'existence de ce cycle chez diverses plantes, ainsi que chez la levure *Schwanniomyces occidentalis*.

Quant à l'acide galacturonique il résulte de l'hydrolyse enzymatique des pectines représentée dans le schéma ci-dessous :



PE = pectine méthylestérase.
PG = polygalacturonase = « pectinase ».
PMG = polyméthylgalacturonase.

L'activité *endo* correspond à la rupture de longues chaines pectiques et l'activité *exo* à la libération de l'acide galacturonique monomère.

Pour conclure quant à la présence simultanée des acides glucuronique et galacturonique dans les moûts et les vins, nous rappelons que :

1° On peut séparer ces deux acides de façon imparfaite par chromatographie sur papier et de façon complète grâce à une nouvelle technique de chromatographie sur papier échangeur d'ions.

2° Le dosage colorimétrique différentiel des acides uroniques appliqué aux moûts et vins permet de conclure à la présence constante d'acide glucuronique, même s'il y a un large excès d'acide galacturonique.

3° Des hétérosides dérivés de l'acide glucuronique ont été identifiés dans les pellicules de raisin et l'acide glucuronique est impliqué dans la synthèse des pectines par les plantes.

Par ailleurs la présence d'acide galacturonique issu de l'hydrolyse des pectines est indiscutée.

Des résultats contraires peuvent s'expliquer par l'emploi de méthodes analytiques insuffisamment précises ou par l'existence de types de vin extrêmement pauvres en acide glucuronique (1 à 2 p. 100 de nos échantillons contenaient moins de 20 mg par l. de cet acide).

II — Importance des acides uroniques dans les moûts et les vins

L'histogramme de la figure 30 montre la répartition des teneurs des moûts et vins pour chacun des acides uroniques. Les valeurs extrêmes rencontrées sont : 0, 110 et 220 mg par l. respectivement pour les minima des acides glucuronique,

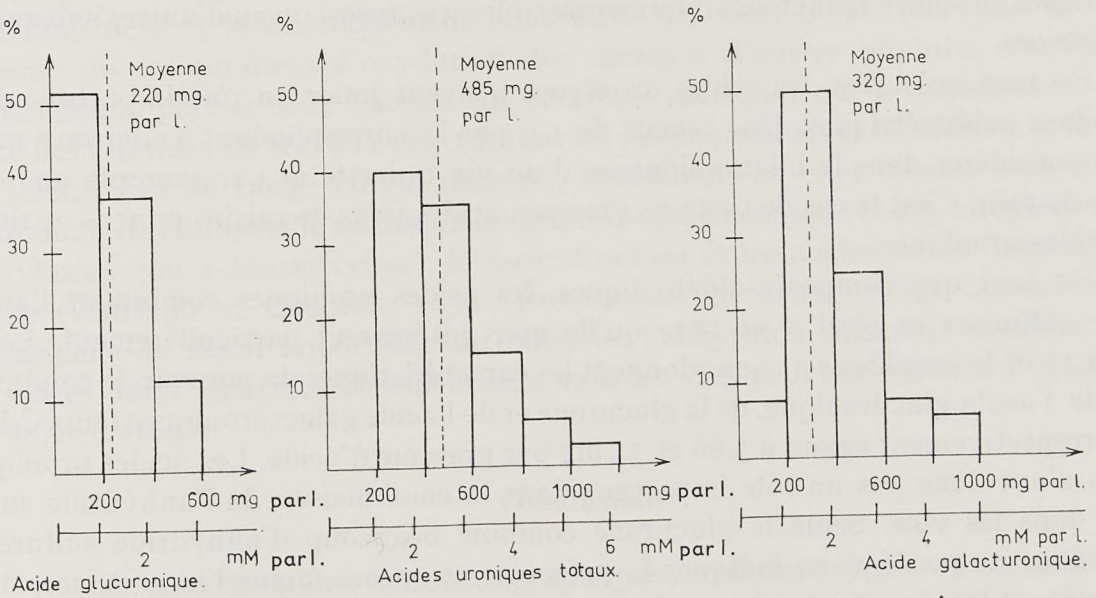


FIG. 30. — *Fréquences des teneurs des moûts et des vins en acides uroniques* (103 échantillons analysés)

galacturonique et uroniques totaux et de 610, 1 040 et 1 480 mg pour les maxima. Seuls trois vins ont été trouvés privés d'acide glucuronique (sur les 103 étudiés).

La présence d'acides uroniques dans les vins a quelques conséquences œnologiques que nous voudrions souligner.

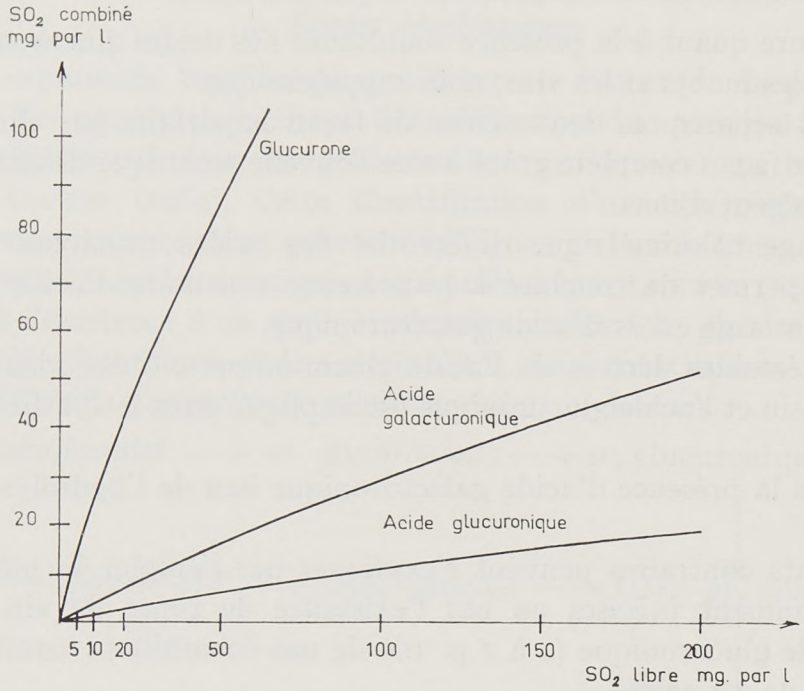


FIG. 31. — *Courbes de combinaison de l'anhydride sulfureux par les acides uroniques à la concentration de 1 g par l*

A cause de leurs propriétés réductrices les acides uroniques sont dosés comme sucres, au moins partiellement, par les méthodes analytiques usuelles, suivant l'efficacité de la défécation. Leur teneur habituellement inférieure à 1,5 g par l. ne saurait cependant expliquer l'existence dans certains vins « secs », certaines années de maturité anormale, de 3 à 5 g par l. de sucres réducteurs. Ces vins doivent être riches en sucres réducteurs infermentescibles (pentoses) ou en d'autres substances réductrices.

En tant qu'acides, les acides uroniques peuvent jouer un rôle important dans les bilans acidimétriques. Une teneur de 1 g par l., correspondant à environ 5 méq., est à considérer dans le bilan anionique d'un vin qui atteint par exemple une centaine de méq. C'est le cas de certains vins peu acides issus de raisins pourris et riches en acides uroniques.

En tant que composés aldéhydiques, les acides uroniques combinent l'anhydride sulfureux et c'est à ce titre qu'ils nous intéressent particulièrement. Le tableau 10 et le graphique 31 nous donnent les caractéristiques du pouvoir de combinaison de l'acide glucuronique, de la glucurone et de l'acide galacturonique ; leurs C-L 50 sont respectivement égaux à 5,86 et 14 mg par gramme d'acide. Les acides uroniques libres n'ont donc pas un rôle important dans la combinaison de l'anhydride sulfureux dans les vins. Seule la glucurone combine beaucoup d'anhydride sulfureux, mais nous ne pouvons en indiquer la présence, et encore moins l'importance, dans les moûts et les vins ; toutes les méthodes analytiques que nous connaissons modifient en effet de façon incontrôlable la position de l'éventuel équilibre acide-lactone.

Le tableau ci-dessous montre que les vins de certaines années sont plus riches que d'autres en acides uroniques.

Acides uroniques totaux suivant l'année de la récolte
Teneur en mg par l

	Minimum	Moyenne	Maximum
Récoltes 1961 et 1962 (30 analyses)..	240	390	640
Récolte 1963 (35 analyses)	220	540	1 480

Les vins de 1963, combinant fortement l'anhydride sulfureux, sont beaucoup plus riches en acides uroniques que ceux de 1961 et 1962 où les raisins récoltés étaient beaucoup plus sains. La pourriture ne semble pas cependant le facteur déterminant car il n'y a aucun enrichissement direct du moût en acides uroniques après culture de moisissures au laboratoire.

D'un autre côté, le moût et le vin blanc correspondant ont la même teneur en acides uroniques. L'action des enzymes pectolytiques, naturels ou ajoutés, ne modifie pas ces teneurs ; ces enzymes modifient la vitesse d'hydrolyse des pectines, mais n'affectent pas leur concentration. Le problème serait sans doute différent en vinification en rouge où la macération des parties solides dans le moût provoque un enrichissement sensible en acides uroniques.

En résumé, on ne peut actuellement dégager les véritables causes des variations, sans doute très complexes, des teneurs des moûts et vins en acides uroniques observées d'une année à l'autre.

Pratiquement nous pouvons dire que les acides uroniques des moûts et des vins fixent environ de 2 à 15 mg d'anhydride sulfureux par l. Leur importance est donc faible à ce point de vue mais ils n'en demeurent pas moins des constituants pondéralement et biochimiquement importants des vins. Il faudrait relier le métabolisme de ces produits d'oxydation des sucres à d'autres produits d'oxydation apparaissant parfois sous l'action de bactéries acétiques ou de moisissures. A la suite des intéressants travaux effectués sur les jus de pommes et les cidres à la Station de Recherches de Long Ashton (Bristol), on connaît en effet comme constituants combinant de l'anhydride sulfureux les acides 2-cétogluconique et 2-5-cétogluconique, la xylosone (ou 2-désoxyxylose), le 5-cétofructose et les acides di- et trigalacturonique (Whiting et Coggins, 1956 ; Burroughs et Sparks,1964). Ces substances participent de façon importante au bilan de l'anhydride sulfureux combiné dans les cidres. Leur recherche et leur dosage dans les vins peuvent constituer également un sujet d'étude.

Conclusions

1. Des considérations chromatographiques, colorimétriques et biochimiques montrent la présence simultanée quasi générale des acides galacturonique et glucuronique dans les moûts et les vins blancs que nous avons examinés.

2. Les moûts et vins contiennent quelques centaines de mg par 1 d'acides uroniques ; l'acide glucuronique, très rarement absent, est en général le moins abondant.

3. Les acides uroniques interviennent dans le dosage des sucres réducteurs (pour moins de 1,5 g par 1 en général), comme constituants acides (jusqu'à 6 ou 8 méq. par 1) et comme fixateurs de l'anhydride sulfureux.

4. En dépit de leurs variations importantes et mal connues, les acides uroniques ont toujours un rôle relativement réduit dans la combinaison de l'anhydride sulfureux dans les vins ; ils n'en fixent que 2 à 15 mg par 1.

CHAPITRE VII

BILANS DES DIVERSES FORMES DE L'ANHYDRIDE SULFUREUX DANS LES VINS

Nous avons vu qu'avant nos travaux, on ignorait la nature d'une fraction importante des combinaisons de l'anhydride sulfureux dans les moûts et les vins. En d'autres termes, seule une fraction limitée de l'anhydride sulfureux est combinée à l'éthanal et au glucose. Pouvons-nous expliquer maintenant après cette étude, une fraction beaucoup plus importante de ces combinaisons ?

I — Établissement de bilans analytiques des combinaisons de l'anhydrique sulfureux

Ces combinaisons sont surtout du type carbonyle-SO_2. Rappelons que les substances aldéhydiques ou cétoniques dont la présence était déjà connue dans les moûts et les vins, autres que l'éthanal et le glucose, n'ont qu'un rôle insignifiant.

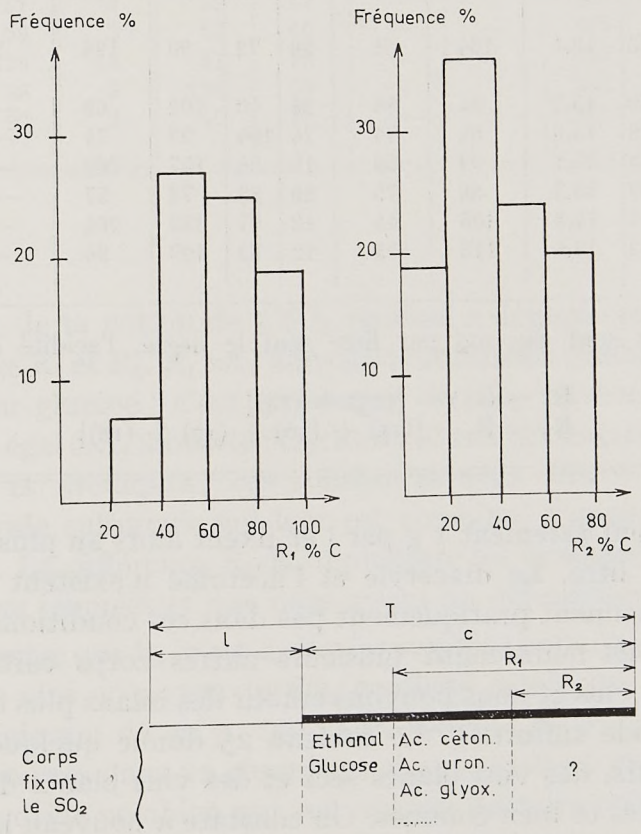


FIG. 32. — *Fréquence des différents pourcentages d'anhydride sulfureux combiné résiduel R_1 et R_2 par rapport à l'anhydride sulfureux combiné total (sur 61 échantillons de vins blancs)*

Le graphique du bas indique la correspondance entre les lettres C, R_1 et R_2 et les formes de l'anhydride sulfureux dans les vins

TABLEAU 25

Bilans de l'anhydride sulfureux dans les moûts et les vins

N° des échantillons		Degré alcool	Acidité totale	Sucres	Glucose	Éthanal	Acide pyruvique	Acide α-céto-glutarique	Acide glyoxylique	Acides uroniques	SO_2 libre	SO_2 combiné
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	Moûts											
1	Ugni blanc 1963	0	338	99	51	0	9	5	8	—	50	33
2	Ugni blanc 1963	0	178	150	74	0	7	21	5	—	50	124
3	Sauternes 1963	0	120	270	130	0	45	29	—	760	50	196
	Vins secs											
4	Colombard 1963	8,0	146	1,5	< 1	18	5	10	2	—	65	74
5	Graves 1962	11,6	78	1,5	< 1	44	50	108	—	400	30	126
6	Vin de pays 1963	8,6	166	1,4	< 1	37	72	76	4	220	22	115
7	Graves 1962	11,4	80	2,1	< 1	62	43	54	—	350	50	166
8	Premières Côtes de Bordeaux 1963	11,0	102	1,7	< 1	51	73	75	—	—	71	179
9	Vin de pays 1963	8,7	138	1,5	< 1	34	41	178	—	—	37	210
10	Sauvignon 1963	11,8	109	1,8	< 1	48	21	80	—	270	23	346
11	Ugni blanc 1963	6,3	252	1,3	< 1	112	65	67	13	290	11	206
	Vins doux											
12	Loupiac 1962	14,1	67	70	28	58	33	44	—	350	60	178
13	Sainte-Croix-du-Mont 1963	13,1	104	54	20	72	90	198	2	—	35	265
14	Sainte-Croix-du-Mont 1960	13,2	84	84	26	40	102	69	—	400	70	320
15	Loupiac 1959	13,8	64	74	26	104	93	74	—	280	42	322
16	Sauternes 1963	15,1	99	59	15	68	157	269	—	740	18	297
17	Barsac 1959	13,3	86	75	29	88	73	57	—	300	60	334
18	Sauternes 1963	14,8	106	44	13	47	332	264	—	510	24	320
19	Sauternes 1963	12,6	113	35	12	62	109	96	—	450	25	451

Toutes les valeurs sont des mg par litre sauf le degré, l'acidité exprimée en méq. les sucres, le glucose en g

$$R_1 = (11) - [(13) + (14)]$$
$$R_2 = R_1 - [(15) + (16) + (17) + (18)]$$

Les pentoses dépassent rarement 1 g par l et fixent alors au plus 8 à 10 mg d'anhydride sulfureux par litre. Le diacétyle et l'acétoïne n'existent que pour quelques mg par l et n'interviennent pratiquement pas dans ces conditions.

Nous connaissons maintenant plusieurs autres corps carbonyliques présents dans les moûts et les vins et nous pouvons établir des bilans plus complets des combinaisons de l'anhydride sulfureux. Le tableau 25 donne quelques exemples de ces bilans dans des moûts, des vins blancs secs et des vins blancs doux d'origine et de vinification différentes et bien connues. On constate à nouveau la grande variabilité de la combinaison de l'anhydride sulfureux dans les vins, tant pour les quantités absolues que pour le rapport des combinaisons inconnues aux combinaisons totales.

TABLEAU 25 (*suite*)

Bilans de l'anhydride sulfureux dans les moûts et les vins

N° des échantillons	C-L 50	SO_2 combiné à						SO_2 résiduel			
		Éthanal	Glucose	Acide pyruvique	Acide α-cétoglutarique	Acide glyoxylique	Acides uroniques	R_1	R_2	R_1 (% C)	R_2 (% C)
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	33	0	15	5	1	7	—	18	5	55	14
2	124	0	22	4	6	4	—	102	88	81	71
3	196	0	39	24	8	—	7	157	118	80	60
4	63	26	0	3	3	1	—	48	41	65	55
5	108	64	0	22	22	—	2	62	16	49	13
6	134	54	0	29	14	3	2	61	13	53	11
7	166	90	0	26	14	—	4	76	32	45	19
8	168	74	0	42	23	—	—	105	40	59	22
9	218	50	0	16	43	—	—	160	101	76	48
10	365	70	0	8	16	—	2	276	260	79	72
11	231	163	0	43	15	7	1	43	20	26	12
12	172	84	13	18	13	—	4	81	46	45	26
13	274	103	4	42	46	1	—	158	69	60	26
14	312	58	15	58	21	—	5	247	163	77	51
15	326	151	9	41	17	—	1	162	102	50	32
16	328	99	3	57	40	—	—	195	98	60	33
17	329	128	14	37	16	—	1	192	136	57	41
18	341	68	2	136	50	—	2	250	62	78	19
19	468	90	2	46	19	—	2	361	294	80	65

Nous inspirant de la notion de « SO_2 résiduel » dégagée par KIELHÖFER, nous utilisons les symboles R_1 et R_2. R_1 est l'anhydride sulfureux combiné qui n'est combiné ni à l'éthanal ni au glucose ; c'est en somme le SO_2 résiduel tel que l'a défini KIELHÖFER. R_2 est égal à R_1 moins le SO_2 combiné aux acides pyruvique, α-cétoglutarique, glyoxylique et uroniques ; ces substances sont dosées individuellement et on calcule l'anhydride sulfureux qui leur est combiné, d'après les graphiques que nous avons donnés. La différence R_1-R_2 représente les combinaisons de l'anhydride sulfureux jusqu'alors ignorées et que nous avons pu déterminer.

La figure 32 montre que R_1, c'est-à-dire les combinaisons qui étaient « inconnues », dépasse suivant les vins 90 p. 100 du SO_2 combiné avec une valeur moyenne de 62 p. 100 et un minimum de 20 p. 100. Actuellement on peut donc établir un bilan complet, à 20 p. 100 près dans un cinquième des cas et il ne reste, en moyenne, que 40 p. 100 de l'anhydride combiné qui soit engagé dans les composés inconnus. Ces valeurs signifient que notre travail a permis de déterminer environ le cinquième des combinaisons inconnues de l'anhydride sulfureux dans les moûts et les vins (50 mg par l en valeur absolue).

1. *Les nouvelles combinaisons de l'anhydride sulfureux dosées*

Les acides pyruvique et α-cétoglutarique combinent de 5 à 200 mg d'anhydride sulfureux par l. Cette combinaison est peu énergique ; elle constitue une fraction importante des possibilités de libération de l'anhydride sulfureux dans un vin (par élévation de température par exemple). D'autre part, ces acides n'étant pas saturés par l'anhydride sulfureux constituent une fraction importante des possibilités de combinaison de l'anhydride sulfureux ajouté à un vin « mangeur de soufre » ou, plus correctement, ayant un taux de combinaison élevé.

L'acide glyoxylique est pratiquement saturé par l'anhydride sulfureux dans les vins, mais il est habituellement peu abondant (5 mg par l en moyenne) et il ne joue qu'un rôle discret dans les combinaisons sulfitiques (10 à 15 mg par l au plus).

Les acides uroniques, beaucoup plus abondants (485 mg par l en moyenne), ont à peu près la même importance que l'acide glyoxylique. On peut compter qu'ils combinent au plus 10 à 25 mg d'anhydride sulfureux par litre.

En résumé, les acides cétoniques et aldéhydiques que nous avons pu caractériser et doser améliorent nettement nos connaissances sur les combinaisons sulfitiques des vins. Ils expliquent en particulier les phénomènes de libération ou de fixation de l'anhydride sulfureux dans certains vins, alors que l'éthanal n'explique que les fixations irréversibles et que le glucose ne peut jouer aucun rôle important. Il reste cependant une fraction notable de l'anhydride sulfureux combiné, que nous avons appelée R_2, qui est fixé à d'autres substances que nous avons seulement identifiées ou que nous n'avons pas caractérisées.

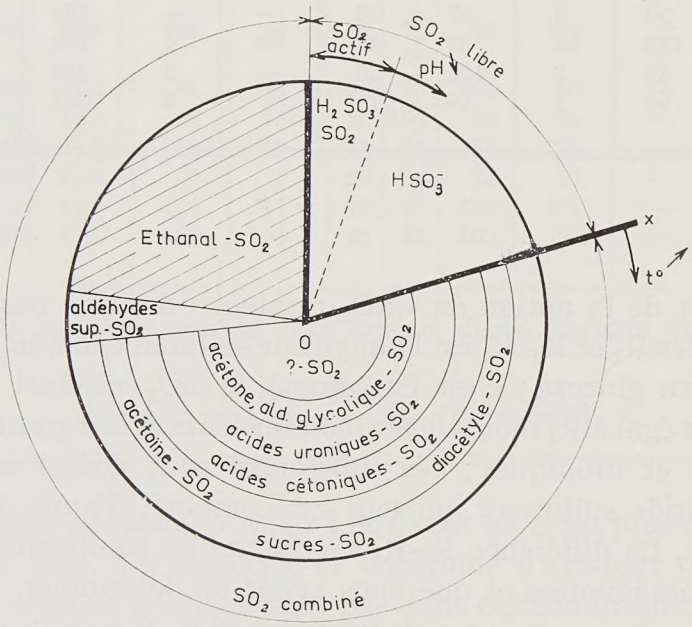


FIG. 33. — *Schéma des différents états de l'anhydride sulfureux dans les vins à la suite de nos travaux.* Le segment hachuré correspond à la fraction du SO_2 combiné fixe et définitive ; le rayon Ox mobile autour du point O matérialise la réversibilité des autres combinaisons

2. *Les nouvelles combinaisons de l'anhydride sulfureux identifiées*

En premier lieu, l'acétone doit augmenter la valeur de R_2, puisque nous avons montré qu'il était dosé comme éthanal mais combinait beaucoup moins fortement l'anhydride sulfureux dans les conditions du vin.

Les aldéhydes supérieurs du vin (le propanal, l'*i*-butanal, l'*i*-pentanal et sans doute l'hexanal et d'autres encore) ne modifient pas nos connaissances car ils sont dosés comme éthanal et combinent l'anhydride sulfureux de la même façon irréversible.

L'acide oxalacétique est peu abondant, et donc peu important, mais il peut en être différemment d'autres acides cétoniques encore mal identifiés (acides acétylacétique, lévulinique, dioxytartrique, dioxyfumarique) ou non identifiés. Les vins sont riches en acides cétoniques divers pouvant fixer ou libérer de l'anhydride sulfureux selon les conditions et ayant alors une grande importance technologique.

Le furfural et l'aldéhyde cinnamique fixent également quelques mg par l d'anhydride sulfureux. La dihydroxyacétone, l'aldéhyde glycérique et l'aldéhyde glycolique ont des constantes de dissociation du même ordre de grandeur que les acides cétoniques. Leurs teneurs sont cependant plus faibles et leur action réelle aussi.

L'ensemble de ces résultats permet de tracer la nouvelle figure des combinaisons de l'anhydride sulfureux dans les vins (fig. 33) ; la comparaison avec la figure 2, qui donne l'état des connaissances avant nos travaux, permet de faire le point des nouvelles acquisitions.

3. *Hypothèses sur les combinaisons inconnues de l'anhydride sulfureux*

On sait que les sucres ne sont fermentés en alcool qu'après transformation en esters phosphoriques (hexoses - phosphates et trioses-phosphates) et on constate que ces esters phosphoriques combinent plus énergiquement l'anhydride sulfureux que les oses correspondants (tabl. 10). Dans le cas, très fréquent, de sulfitage avant fermentation, il doit y avoir combinaison entre les oses-phosphates et l'anhydride sulfureux. Ces réactions peuvent avoir un rôle important dans la mesure où les oses-phosphates restent stables après la fin de la fermentation. Des dosages enzymatiques permettraient de répondre à cette question.

Les polyphénols fixent l'anhydride sulfureux, habituellement en se décolorant, de façon irréversible ou non. Bien que peu abondants dans les vins blancs (de 10 à 200 mg par l exprimés en acide tanique), ils y jouent certainement un petit rôle. Leur effet est plus important dans les vins rouges, beaucoup plus riches en polyphénols divers, dont les propriétés, et sans doute la réactivité vis-à-vis de l'anhydride sulfureux, varient selon l'état de polymérisation et d'oxydation.

Enfin, et c'est un des premiers effets connu du sulfitage, l'anhydride sulfureux inactive les polyphénol-oxydases du raisin de façon plus ou moins irréversible selon les concentrations mises en jeu. On ne connaît guère le mécanisme de cette action mais là encore il y a certainement combinaison, et pas seulement réduction.

Pour nous résumer, on peut dire que l'étude systématique des combinaisons inconnues de l'anhydride sulfureux dans les moûts et les vins a permis de faire avancer nos connaissances sur le sujet de trois façons :

1° De nouveaux dosages nous ont permis de déterminer en moyenne 60 p. 100 des combinaisons de l'anhydride sulfureux dans les vins.

2° De nouvelles identifications complètent qualitativement ces connaissances.

3° Plusieurs hypothèses importantes ouvrent de nouvelles perspectives de recherches.

L'ensemble de ce travail permet maintenant de dégager plusieurs conséquences pratiques et ces connaissances doivent favoriser l'obtention de meilleurs vins.

II — Conséquences technologiques des combinaisons de l'anhydride sulfureux

En relisant les pages précédentes, on prévoit facilement les techniques qui améliorent ou qui pourront améliorer l'équilibre SO_2 libre-SO_2 combiné dans les moûts et les vins. Sans reprendre en détail ce qui a été déjà dit (PEYNAUD, 1964 ; BLOUIN, 1964 ; PEYNAUD et BLOUIN, 1965), nous dégagerons simplement les principales possibilités offertes à l'œnologue.

Rappelons d'abord que la combinaison éthanal-SO_2 est presque toujours la plus importante. On en diminuera la valeur en empêchant la formation d'éthanal, par exemple en évitant le sulfitage des moûts, en mutant des vins aussi pauvres que possible en levures et en évitant toute refermentation (RIBÉREAU-GAYON et PEYNAUD, 1960-61).

D'une façon générale le sulfitage avant fermentation augmente la combinaison ultérieure de l'anhydride sulfureux dans les vins. Il est cependant souvent nécessaire en vinification en blanc (protection contre la casse oxydasique et contre les oxydations partielles, développement de l'arôme), alors qu'on peut le supprimer, ou fortement le réduire, au cours de la vinification en rouge de raisins sains. Dans tous les cas l'homogénéité du sulfitage est une donnée très importante à respecter.

Pour de nombreuses raisons, il faut tout mettre en œuvre pour récolter une vendange aussi saine que possible ou, lorsqu'on recherche les vins liquoreux, ayant une véritable « pourriture noble » dans les rares situations favorables à son développement. La pourriture, et encore plus les bactéries acétiques qui l'accompagnent, accroissent le taux de combinaison de l'anhydride sulfureux du moût en favorisant la formation de substances fixatrices de l'anhydride sulfureux pendant la fermentation. Cette formation résulte sans doute d'un appauvrissement du moût en facteurs de croissance ou au contraire de son enrichissement en inhibiteurs. A défaut d'un contrôle au vignoble du degré et de l'état de pourriture du raisin, on voit deux possibilités de traitements au chai de ces moûts issus de raisins pourris. On peut les enrichir en facteurs de croissance (la thiamine réduit le taux d'acide pyruvique) ou au contraire les appauvrir en inhibiteurs par chauffage.

Le chauffage des moûts diminue la formation d'acides cétoniques pendant la fermentation et permet de supprimer le sulfitage du moût en détruisant les polyphénol-oxydases. Le chauffage modéré avant mutage (40°C environ) provoque un arrêt de fermentation et facilite la conservation du vin (BLOUIN et BERROUET, 1964). Enfin le chauffage du vin à la mise en bouteilles permet de réduire le taux d'anhydride sulfureux libre nécessaire à la conservation du vin. Cependant ces trois modalités de chauffage peuvent modifier les caractères organoleptiques du vin (surtout le chauffage du moût) dans des proportions qu'il convient d'étudier dans chaque cas. On doit retenir cependant que le chauffage est le seul procédé physique efficace dans le cas de moûts ou de vins à fort pouvoir de combinaison.

Par ailleurs, il est possible d'éliminer les acides cétoniques et sans doute d'autres composés carbonyliques, en traitant le vin par des échangeurs d'anions sous forme sulfite et bisulfite. Cette technique inédite est bien entendu actuellement interdite.

On en ignore les conséquences hygiéniques et organoleptiques. Elle nous apparaît surtout comme une thérapeutique à appliquer dans les cas extrêmes de combinaisons anormales d'anhydride sulfureux.

D'une façon plus pratique, on peut réduire les effets d'une combinaison très élevée d'anhydride sulfureux en diminuant le taux du SO_2 libre nécessaire à la conservation. Outre l'action déjà vue du chauffage, on peut citer l'emploi d'acide ascorbique qui renforce l'action antioxydante de l'anhydride sulfureux, ou parmi les antiseptiques l'acide sorbique, ou lorsque ce produit est autorisé, le pyrocarbonate d'éthyle, (Blouin et Barthe, 1963). Ces techniques réduisent les conséquences d'une combinaison élevée de l'anhydride sulfureux, sans en modifier l'importance réelle ; en somme elles déplacent le problème sans contribuer à le résoudre.

En résumé, que peut-on faire pour réduire la combinaison de l'anhydride sulfureux dans les vins et satisfaire ainsi à la fois l'hygiéniste et le technicien ?

En l'absence de remèdes complètement efficaces, on ne saurait trop inciter à utiliser pleinement toutes les techniques d'efficacité reconnue. D'une façon plus précise nous recommandons :

— Récolter des raisins aussi sains que possible et réserver le développement de la pourriture noble et la recherche de moûts naturellement très sucrés destinés à la production de vins liquoreux aux seules situations appropriées.

— Le sulfitage du moût est souvent nécessaire ; il faut alors sulfiter de façon très homogène, dès l'extraction du jus des baies, en éliminant toute macération des parties solides et avec une dose suffisante, particulièrement dans le cas souvent favorable de débourbage.

— Lors du mutage dans l'élaboration de vins doux, il faut veiller à l'élimination préalable des levures et utiliser une dose suffisante d'anhydride sulfureux, puis multiplier les soutirages (éventuellement les filtrations) en maintenant un taux suffisant d'anhydride sulfureux libre et en intensifiant les habituelles mesures de propreté.

— Ne mettre en bouteilles que des vins stabilisés, en employant la filtration stérile ou l'embouteillage à chaud et en complétant l'action de l'anhydride sulfureux par l'acide ascorbique ou l'acide sorbique si nécessaire.

Ces règles simples donnent satisfaction, sans nous faire oublier cependant que le fond du problème demeure. L'étude théorique que nous avons entreprise était la seule façon rationnelle de le résoudre. Elle nous a effectivement permis de montrer l'importance qu'ont les phénomènes de la maturation et de l'altération des raisins et de la fermentation du moût. Nous avons pu orienter les recherches techniques qui restent à faire vers le contrôle de l'état sanitaire des raisins, l'amélioration de la fermentation alcoolique par addition de facteurs de croissance, ou le choix de conditions favorables d'aération et de levurage, le rôle prépondérant de la technique de mutage. En dépit de la généralité de ces conseils pratiques, ces résultats nous paraissent déjà utiles.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Sans reprendre les conclusions partielles développées à la fin de chaque chapitre, il nous paraît nécessaire de conclure ce travail en dégageant les principales nouveautés

qu'il a apportées dans la connaissance des combinaisons de l'anhydride sulfureux dans les moûts et les vins, en nous plaçant sur les différents plans analytique, biochimique ou technologique.

Sur le plan analytique

Pour définir avec exactitude le pouvoir de combinaison d'un échantillon vis-à-vis de l'anhydride sulfureux, nous l'avons caractérisé par l'indice « C-L 50 », ou anhydride sulfureux combiné pour 50 mg de SO_2 libre par l, quand il s'agit d'un milieu complexe contenant un mélange de substances fixatrices d'anhydride sulfureux, ou quand il s'agit d'un corps pur, par la constante de dissociation chimique K de la combinaison sulfitique. Cet indice est déterminé par le calcul ou graphiquement après des essais de combinaison comportant des additions croissantes d'anhydride sulfureux au même échantillon.

Pour établir une étude analytique des phénomènes, nous avons dû mettre au point une dizaine de méthodes analytiques afin d'identifier puis de doser des substances dont la présence dans les vins était peu ou pas connue. Nous les rappelerons simplement : l'étude systématique des composés carbonylés acides ou neutres par chromatographie sur papier et sur couche mince de leurs dinitrophénylhydrazones, la séparation des acides glucuronique et galacturomique par chromatographie sur papiers échangeurs d'ions, le dosage enzymatique optique de plusieurs composés carbonylés. A notre connaissance ces deux dernières techniques ont été ainsi utilisées pour la première fois en œnologie analytique, où elles sont appelées à rendre de grands services.

A l'aide de ces méthodes de dosage, nous avons amélioré notre connaissance de la composition des moûts et des vins et en particulier nous avons pu compléter des bilans analytiques habituellement déficitaires, tels ceux des anions, des produits secondaires de la fermentation alcoolique, de l'extrait sec et des sucres réducteurs.

Sur le plan biochimique

Par l'application de ces méthodes, nous avons identifié et dosé de nombreuses substances issues généralement du métabolisme microbien et ayant une grande importance biochimique. Sans en reprendre la liste complète, nous soulignerons la signification particulière de la présence, à doses assez élevées, des acides pyruvique et α-cétoglutarique, et pour une moindre part de divers aldéhydes supérieurs, de l'aldéhyde glycolique et vraisemblablement glycérique, et de l'acétone. Les taux des acides pyruvique et α-cétoglutarique sont extrêmement variables, parfois de 1 à 10, selon le stade de la fermentation et les conditions du milieu. Ces substances et les phénomènes qui les forment ont donc un importance technologique considérable vis-à-vis des problèmes pratiques de la combinaison de l'anhydride sulfureux.

D'un autre côté, plusieurs observations convergentes nous ont montré le rôle primordial du développement de la « pourriture » sur les raisins et surtout d'une certaine « qualité » de cette pourriture. Plus que le développement de *Botrytis cinerea*, en effet, il apparaît que le développement de bactéries acétiques sur les raisins dont la pellicule a été digérée par la moissure et qui ainsi ne sont plus protégés, est la cause essentielle du pouvoir de combinaison anormalement élevé des vins de certaines récoltes.

L'analyse détaillée nous a permis d'établir, pour chaque moût ou vin, un bilan presque complet des états de l'anhydride sulfureux, c'est-à-dire de déterminer les différentes fractions constitutives de « l'anhydride sulfureux combiné ». Ces bilans demeurent généralement incomplets car nous n'avons pu encore déterminer toutes les substances fixatrices de l'anhydride sulfureux. Ils permettent cependant de faire le point de l'état de nos connaissances à ce sujet : certains bilans sont exacts à 90 p. 100 mais il reste encore dans certains 25 p. 100 des combinaisons inconnues.

Sur le plan technologique

Connaissant maintenant la plupart des substances responsables de la combinaison de l'anhydride sulfureux dans les vins, on peut essayer d'orienter les vinifications pour diminuer la quantité d'anhydride sulfureux combiné. A défaut de techniques complètement efficaces, il est possible néanmoins d'indiquer plusieurs améliorations aux méthodes actuelles. Les acides pyruvique et α-cétoglutarique, à cause de leur teneur et de leur pouvoir de combinaison, ont un rôle essentiel dans la fixation de l'anhydride sulfureux ajouté à un vin biologiquement stable. L'étude précise de leur métabolisme sera un des principaux sujets de futures recherches. D'ores et déjà on doit conseiller la récolte de raisins aussi sains que possible et, d'une façon générale mais impérative, il faut appliquer les règles rationnelles d'un bon sulfitage, qui doit être prévu suffisant, homogène, et d'une bonne conservation des vins grâce à l'élimination des levures, à la propreté du matériel, à la stabilisation biologique, à l'aération contrôlée. On peut fonder quelque espoir sur la modification des fermentations par certains activateurs et sur la fixation sélective de composés carbonylés fixateurs d'anhydride sulfureux par des résines échangeuses d'anions correctement chargées.

En résumé, si nos recherches ne bouleversent pas la technologie classique des vinifications, elles mettent en évidence certains mécanismes fondamentaux de la combinaison de l'anhydride sulfureux dans les moûts et les vins et permettent de comprendre les « combinaisons anormales », cauchemars des producteurs de vins blancs doux. A partir de cette compréhension nouvelle, on peut chercher, puis trouver les causes et les remèdes aux phénomènes normaux ou « anormaux » de combinaison de l'anhydride sulfureux. Quoique encore incomplètes, nos recherches apportent donc d'utiles renseignements à l'œnologue et au biochimiste en les dotant de méthodes de recherche, en leur indiquant les divers constituants fixateurs d'anhydride sulfureux et surtout en ouvrant plusieurs voies de recherches dans l'étude des phénomènes : action des bactéries acétiques sur le raisin, métabolisme des fermentations en fonction des conditions du milieu, phénomènes d'oxydo-réduction, lutte contre la « pourriture » des raisins, contrôle des fermentations et des mutages.

Ainsi notre travail éclaire sans le résoudre encore tout à fait le problème difficile des combinaisons sulfitiques. Il nous semble avoir fait œuvre utile en enrichissant nos connaissances analytiques et biochimiques dans le but final d'obtenir des vins toujours meilleurs.

SUMMARY

CONTRIBUTION TO THE STUDY OF THE BINDING
OF SULPHUR DIOXIDE IN MUSTS AND WINES

An important fraction of sulphur dioxide added to grape-juice and to wine combines with unknown compounds ; the author intends to ascertain these compounds.

First of all he studies the global view of the phenomenon of the binding of sulphur dioxide and its variations in function of conditions of wine-making and preservation. He proves the importance of the healthy state of the grapes and founds that the carbonylic compounds are the main agents of this binding. He determines then the equilibrium constant of fifty bisulphite-compounds which are formed.

In a second part the author describes the methods of identification and quantitative determination which he has tested to determine these carbonylic compounds : paper chromatography, thin layer chromatography of dinitrophenylhydrazons, optical enzymatic analysis and ion-exchange paper chromatography.

The last part of the work describes the acquired results. Various keto-acids, aliphatic aldehyds, ketones and uronic acids more or less unknown have been identified in grape-juices and wines. Several were proportionned in many specimen procured in various conditions : pyruvic, α-ketoglutaric, oxalacetic, glyoxilic, glucuronic and galacturonic acids and dihydroxyaceton. Thus we know the medium tenors of these compounds and henceforth it is possible to understand the motives of the huge variability of the comportment of the sulphur dioxide in Œnology.

As a conclusion the author draws up several balance-sheets of the differents states of sulphur dioxide in the grape-juices and wines and shows the principal ways, that may be possible, of any progress in this matter in function of the theorical studies and pratical essays which he led.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

McArdle B. M., 1957. The quantitative estimation of pyruvic and oxoglutaric acids by paper chromatography in blood, urine and cerebro-spinal fluid. *Biochem. J.*, **66**, 144.

Arni P. C., Percival E. G. V., 1951. Studies on fructosans. *J. Chem. Soc.*, 1822.

Baraud J., 1962. Quelques aspects de l'utilisation de la chromatographie en phase vapeur en biochimie. *Mises au point de chimie analytique*, Masson, Paris, 10e série, p. 80.

Baraud J., 1954. Étude des dérivés naturels de l'acide tartrique. Thèse Sciences naturelles, Bordeaux. *Ann. chimie*, **9**, 535.

Benvegnin L., Capt E., Piguet G., 1951. *Traité de vinification*. 2e édition, Payot, Lausanne:

Bergmeyer H. U., 1963. *Methods of enzymatic analysis*. Academic Press.

Blouin J., 1964. Application des méthodes enzymatiques optiques au dosage de certains constituants des boissons. *Chim. anal.*, **46**, 513.

Blouin J., 1962. Note sur la préparation des vins blancs secs en Bordelais. *Progr. agric. vitic.*, **79**, 144.

Blouin J., 1964. Les combinaisons de l'anhydride sulfureux dans les moûts et les vins. *Progr. agric. vitic.*, **81**, 29.

Blouin J., Barthe J. C., 1963. Étude du pyrocarbonate d'éthyle. Essais d'utilisation pratique. *Vignes et vins*, **119**, 13.

Blouin J., Barthe J. C., 1963. Utilisation pratique d'enzymes pectolytiques en œnologie. Mesure de l'activité des produits commercieux. *Ind. agric. alim.*, **80**, 1169.

Blouin J., Berrouet J. C., 1964. Essais de stabilisation des vins blancs doux par action de la chaleur avant mutage. Rapport intérieur I. T. V.

Blouin J., Peynaud E., 1963. Présence constante des acides glucuronique et galacturonique dans les moûts de raisins et les vins. *C. R. Acad. Sci.*, **256**, 4774.

Blouin J., Peynaud E., 1963. Présence constante des acides pyruvique et α-cétoglutarique dans les moûts de raisins et les vins. *C. R. Acad. Sci.*, **256**, 4521.

Blouin J., Sudraud P., 1965. Dosage de l'anhydride sulfureux dans les moûts et les vins. *Bull. Scient. et Tech. Répres. Fraudes*, **1**. 17,

Boidron J. N., 1966. Essai d'identification des constituants de l'arôme des vins de *Vitis vinifera* L. Premiers résultats. Thèse Doctorat 3e cycle, Bordeaux.

Burroughs L. F., Parks A. H. S., 1962. The effect of condition of fruit on the sulphur dioxide binding power of cider. *Annu. Rep. Long-Ashton Res.*, 151.

Burroughs L. F., Whiting G. C., 1960. The sulphur dioxide combining power of cider. *Annu. Rep. Long Ashton Res. Station*, 144.

Carr J. G., Goggins R. A., Whiting G. C., 1963. Metabolism of fructose and glucose by acetic acid bacteria. *Chem. Ind.*, p. 1279.

Cassignard R., 1963. Étude expérimentale de la vinification en blanc. Thèse Doctorat d'Université, Bordeaux.

Charpentié Y., 1954. Contribution à l'étude biochimique des facteurs de l'acidité des vins .Thèse Docteur-Ingénieur, Bordeaux. *Ann. Technol. agric.*, **3**, 89.

Chouchak D., 1928. La présence de l'acide glucuronique dans les vins provenant de vendanges pourries ou eudémisées. *Ann. Falsif. Fraudes*, **21**, 198.

Deibner L., 1963. État actuel de nos connaissances sur les acides cétoniques des vins. *Ann. Technol. agric.*, **12**, 229.

Deibner L., 1956. Données actuelles sur le processus de l'oxydation de l'acide tartrique et sur la séparation chromatographique des acides organiques des vins. *Ann. Technol. agric.*, **5**, 141.

Dimotaki-Kourakou V., 1962. *Communication à la Sous-Commission de l'O. I. V.*, Paris, mai.

Dimotaki-Kourakou V., 1963. *Dosage d'acides uroniques dans les vins : Méthode nº 131.* Sous-Commission de l'.O I. V.

Dimotaki-Kourakou V., 1964. Absence d'acide glucuronique dans les vins. *Ann. Technol. agric.*, **3**, 301.

Dische Z., 1947. A new specific color reaction of hexuronic acids. *J. Biol. chem.*, **167**, 189.

Dupuy P., 1959. L'inhibition par l'acide sulfureux de l'oxydation de l'éthanol par *Acetobacter rancens*. *Ann. Technol agric.*, **3**, 233.

Dupuy P., 1957. Les *Acetobacter* des vins. Identification de quelques souches. *Ann. Technol agric.*, **6**, 217.

Dupuy P., 1960. Le métabolisme de l'acide tartrique. *Ann. Technol. agric.*, **9**, 139.

McFadden B., Howes W. V., 1960. Determination of glyoxylic acid in biological systems. *Anal. Biochem.* **1**, 240.

Farnsteiner K., 1904. Über organisch gebundene schweflige Säure in Nahrungsmittel. *Z. f. Unters der Nahrungsmittel*, **7**, 449.

Flanzy M., André P., 1959. Désulfitation des jus de raisin. *Ann. Technol. agric.*, **2**, 171.

Friedemann T. E., Haugen G. E., 1963. The determination of ketoacids in blood and urine. *J. Biol. chem.*, **147**, 415.

Gehman H., Osman E. M., 1954. The chemistry of the sugar-sulfite reactions and its relationship in food problems. *Advances in food research*, **5**, 53.

Genevois L., 1936. Acide succinique et glycérine dans la fermentation alcoolique. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **42**, 295.

Genevois L., 1962. La fermentation alcoolique fonction du milieu. *Mises au point de chimie analytique*, Masson Paris, 10e série, p. 50.

Genevois L., 1964. Analyse par formation et séparation de dérivés polynitrés. *Chim. anal.*, **46**, 539.

Gentilini L., Cappelleri G., Paronetto L., 1963. Ricerche di profile chimici costituzionali a protezione dei veri Recioti. *Atti. Accad. Ital. Vite vino*, **15**, 57.

Georgeakopoulos G., Dimotaki-Kourakou V., Lydadi-Kriesi N., 1963. La teneur des vins en acides uroniques. *Chimica Chronika*, **28**, 161.

Germain P., Conduché A., 1932, in *Traité de chimie minérale*, Pascal P. Masson éd. Paris, T 2, p. 125.

Guimberteau G., Portal E., 1961. Contribution à la recherche de l'acide benzoïque et des acides phénols dans les vins. *Ann, Falsif. Exp. chim.*, **54**, 330.

Grignard V., Dupont G., Locquin R., 1950. *Traité de chimie organique*, Masson éd., Paris, T. 7, p. 88.

El Hawary M. F. S., Thompson R. H. S., 1953. Separation and estimation of blood keto acids by paper chromatography. *Biochem. J.*, **53**, 340.

Hébré C., (Communication personnelle, 1964).

Hennig K., 1943. Les substances de l'arôme des vins. Nouveaux procédés de détermination de la qualité des vins. *Bull. Inter. Vin*, **158**, 8.

Hennig K., Burkhardt R., 1957. Über die Gerbstoffe und Polyphenole der Weine. *Naturwissenschaft*, **44**, 328.

Ingram M., 1948. The germicidal effects of free and combined sulphur dioxide. *J. S. C. I.*, **67**, 18.

Jaulmes P., 1963. De la distillation à la chromatographie. *Mises au point de chimie analytique*, 11e série., p. 1154. Masson, Paris.

Joslyn M. A., 1952. Chemistry of sulfite addition products. *Amer. Soc. Enol. Proc.*, **3**, 59.

Joslyn M. A., Braverman J. B. S., 1954. The chemistry and technology of the pretreatment and preservation of fruit and vegetables products with sulfur dioxide and sulfite. *Adv. Food Res.*, **5**, 97.

Kerp W., 1904. Zur Kenntnis der gebundenen schwefligen Säure. *Arb. aus dem K. Gesuntheitsamte*, **21**, 141, 156, 180, 372.

Kerp W., Baur E., 1907. *Ibidem*, **26**, 232, 269, 297.

Kerp W., Wöhler P., 1909. *Ibidem*, **32**, 89.

Kertesz Z. I., 1935. The determination of glucuronic and galacturonic acids by Bertrand's method. *J. Biol. chem.*, **108**, 127.

Khym J. X., Doherty D. G., 1952. The analysis and separation of glucuronic and galacturonic acids by ion exchange. *J. amer. chem. Soc.*, **74**, 3199.

Kielhöfer E., 1958. Die Bindung der schwefligen Säure and Weinbestandteile. *Weinberg u. Keller*, **5**, 561.

Kielhöfer E., 1963. État et action de l'acide sulfureux dans les vins. Règles de son emploi. *Symposium International d'Œnologie*, Bordeaux, juin 1963. *Ann. Technol. agric.*, 12, n° hors série 1, p. 77.

Kielhöfer E., Würdig G., 1959. Der Verbrauch von schwefliger Säure in Most und Wein aus gesunden und faulen Trauben. *Weinber u. Keller*, **6**, 364.

Kielhöfer E., Würdig G., 1960 *a*. Die an Aldehyd gebundene schweflige Säure im Wein. *Weinberg u., Keller*, **7**, 16 et 50.

Kielhöfer E., Würdig G., 1960 *b*. Die an umbekannte Weinbestandteile gebundene schweflige Säure (Rest SO_2) und ihre Bedeutung für den Wein. *Weinberg u. Keller*, **7**, 313 et 361.

Kiessling W., 1949. Formation d'acide triosephosphorique au cours de la fermentation alcoolique. *Ind. Alim. agric.*, **66**, 111.

Kuroïwa Y., Kokubo E., 1959. Some studies on organic acids in beer. *Report Res. Labor. Kirin Brew.*, **2**, 49.

Lafon M., 1955. Contribution à l'étude de la formation des produits secondaires de la fermentation alcoolique. Thèse Doct., Bordeaux. *Ann. Technol. agric.*, **4**, 169.

Lafon-Lafourcade S., 1955. Contribution à l'étude des activeurs et des inhibiteurs de la fermentation alcoolique des moûts de raisin. Thèse Ingénieur-Docteur, Bordeaux. *Ann. Technol. agric.*, **3**, 283.

Lederer E., 1959. *Chromatographie en chimie organique et biologique.* Masson éd., Paris.

LEFÈVRE K. U., TOLLENS B., 1907. Untersuchungen über die Glucuronsäure, ihre quantitative Bestimmung und ihre Farbenreaktionen. *Ber. Deutsch. Chem. Gesel.*, **40**, 4513.

LOEWUS F. A., 1963. Étude de la formation de l'acide ascorbique dans les plantes par éléments marqués. *Phytochemistry*, **2**, 109.

LYNCH D. L., HEARNS Z. E., COTNOIR Sr., 1957. The determination of polyuronides in soil with carbazole. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, **21**, 160.

MESTRE R., 1953. Constante de volatilité de l'acide glyoxylique en solution diluée. *Bull. Soc. Chim.*, 520.

MOREAU L., VINET E., 1927. Contribution à l'étude de l'acide sulfureux en vinification. I. Son réglage au moyen des indices de combinaison. *Ann. Falsif. Fraudes*, **20**, 316.

MOREAU L ., VINET E., 1928. II. L'acide sulfureux antiseptique dans les moûts de raisin et les vins blancs doux. *Ann. Falsif. Fraudes*, **21**, 130.

MOREAU L., VINET E., 1933. III. Sur la dissociation de l'anhydride sulfureux combiné dans les moûts de raisin et dans les vins. *Ann. Falsif. Fraudes*, **26**, 454.

MOREAU L., VINET E., 1937. Sur la détermination du pouvoir antiseptique réel de l'acide sulfureux dans les moûts et les vins par la méthode de l'index iodé. *C. R. Acad. Agric.*, **23**, 570. *Rev. Vitic.*, **87**, 25 et 61.

PAUL T., 1914. *Nahrungsmittelchemie mit besonderer Berücksichtigung der modernen physikalischenschemischen Lehren*, Akademish Verlag, Leipzig.

PEYNAUD E., 1964. Combinaisons normales et anormales de l'anhydride sulfureux dans les vins. *Bull. Union nat. Œnol.*, n° 15, p. 33.

PEYNAUD E., BLOUIN J., 1965. Sui problemi delle combinazioni dell' anidride solforosa nei vini. *Industrie agrarie*, **3**, 1.

PEYNAUD E., DOMERCQ S., 1961. Présence démontrée de bactéries lactiques sur les raisins mûrs. *C. R. Acad. Sci.*, **252** 3343.

PEYNAUD E., DOMERCQ S., 1962. Observations nouvelles sur la microflore des raisins. *Bolletino di ricerche Marsala*, **1**, 65.

PEYNAUD E., LAFON-LAFOURCADE S., 1952. Les conditions d'emploi de l'anhydride sulfureux dans les vins liquoreux. *Bull. O. I. V.*, **252**, 110.

RENTSCHLER H., TANNER H., 1955. Über den Nachweis von Gluconsäure in Weinen aus edelfaulen Trauben. *Travaux Chim. Alim. Hyg.*, **46**, 2, 200.

RIBÉREAU-GAYON G., 1964. Méthodes et techniques d'étude du métabolisme des limbes et des baies de *Vitis vinifera* L. utilisant les molécules marquées par le carbone 14. Résultats préliminaires. Thèse Doct. Œnol., Bordeaux.

RIBÉREAU-GAYON P., 1964. Les composés phénoliques du raisin et du vin. *Ann. Physiol vég.*, **6**, 119 et 211.

RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., 1958. *Analyse et contrôle des vins*. Librairie Ch. Béranger, Paris.

RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., 1960-1961. *Traité d'œnologie*, 2 tomes, Librairie Ch. Béranger, Paris.

ROUDIER A., EBERHARD L., 1955. Séparation des acides uroniques et aldobiuroniques formés dans l'hydrolyse partielle du bois de Pin maritime. *C. R. Acad. Sci.*, **240**, 2012.

SÉMICHON L., FLANZY M., 1933. Sur les acides organiques du jus de raisin. *C. R. Acad. Sci.*, **197**, 198

STÜHRK A., MULLER K. A., 1961. Beobachtungen und Versuche über der SO_2-Bedarf von 1960 er Weissweinen. *Wein u. Rebe*, **43**, 496.

SUOMALAINEN H., RONKAINEN P., 1963. Les composés carbonylés de différents distillats de vins. *Tek. Kern. Aiko.* (Helsinki), **20**, 413.

VAS K., INGRAM M., 1949. Preservation of fruit juices with less SO_2. *Food Manufacture*, **24**, 414.

VENTRE J., 1939. Contribution biochimique à l'étude des vins eudémisés. *Ann. Éc. nation. Agric. Montpellier*, **25**, 203.

VIRTANEN A. J., MIETTINEN D. K., KUNTTU H., 1953. Keto acids in green plants. *Act. Chem. Scand.*, **7**, 38.

WEBB A. D., RIBÉREAU-GAYON P., BOIDRON J. N., 1963. *a*) Premières observations sur l'étude des substances odorantes des vins. *C. R. Acad. agric.*, 115. *b*) Composition d'une essence extraite d'un vin de *V. Vinifera* (« var. Cabernet-Sauvignon »). *Bull. Soc. Chim.*, 6, 1415.

WHITING G., GOGGINS K. A., 1960. Organic metabolism acid in cider and perry fermentation. III. Keto-acids in cider-apple juices and ciders. *J. Sci. Food Agric.* **12**, 705.

WOLF J., 1955., In PAECH K., TRACEY M. V. *Moderns methods in plant analysis*, Springer Verlag, Berlin, T. 2, p. 525.

Ann. Technol. agric., 1966, **15** (4).

CHRONIQUE DES LIVRES

SZAKVARY A. — LES RÉSIDUS DES PRODUITS DITS PHYTOSANITAIRES SUR LES FRUITS ET LÉGUMES : LEURS INCIDENCES POSSIBLES. ENQUÊTE AUPRÈS DES PRODUCTEURS. — Paris, Imprimerie Foulon, 187 pages.

Dans cet opuscule, l'auteur donne d'abord un aperçu de la réglementation actuellement en vigueur en France concernant les produits phytosanitaires, et des risques encourus par les utilisateurs.

Il consacre ensuite une importante deuxième partie aux facteurs qui interviennent dans la formation et la persistance des résidus, en se limitant aux fruits et aux légumes. Le chapitre se termine par un court exposé sur les fongicides, les herbicides et les solvants.

La troisième partie traite des aspects particuliers de quelques risques et des problèmes posés par l'usage des antibiotiques ainsi que des dangers de cancérisation pouvant résulter de la présence de résidus dans les fruits et légumes.

Les conditions particulières à la conservation des fruits et légumes par appertisation sont étudiées dans la quatrième partie. Elles mettent en évidence que le procédé donne, quant aux résidus de pesticides, et comparativement aux denrées à l'état frais, des garanties nettement supérieures.

La cinquième partie relate les résultats d'une enquête menée personnellement par l'auteur auprès des producteurs. Elle démontre que ceux-ci ne sont pas toujours conscients des dangers qu'implique l'usage des produits phytosanitaires. Les délais réglementaires semblent toutefois généralement respectés.

En dernière partie, on propose certaines solutions susceptibles, sinon de supprimer, du moins de diminuer le danger qu'entraîne l'emploi des produits phytosanitaires.

Ce livre a été réalisé sous les auspices du Pr GOUNELLE, membre de l'Académie nationale de Médecine, et préfacé par le Pr LE MOAN, professeur agrégé à la Faculté de Pharmacie de Paris.

Ann. Technol. agric., 1966, **15** (4).

TABLE DES MATIÈRES DE L'ANNÉE 1966

Lucette André. — Caractérisation des composés carbonylés et dosage de l'acétaldéhyde dans certains vins par chromatographie en phase gazeuse. 159
P. Barre. — Recherches sur les bactéries lactiques des vins. I. — Isolement et classification 173
P. Barre. — Détermination rapide de la nature optique de l'acide lactique produit dans les fermentations bactériennes. Ses applications dans la classification des *Lactobacillaceae* Winslow et *al* 203
C. Bayonove. — Étude de trois méthodes de dosage de sucres réducteurs.... 139
J. Blouin. — Contribution à l'étude des combinaisons de l'anhydride sulfureux dans les moûts et les vins. Première partie 223
Deuxième partie 359
J. Chauvet, P. Bréchot, Madeleine Croson, R. Irrmann. — Étude de la croissance anaérobie des levures au cours de vinification par macération de raisins entiers 99
L. Deibner, Mireille Cabibel-Hugues. — Dosage électrophotométrique des acides pyruvique et α-cétoglutarique dans les jus de raisin et les vins après séparation de leurs dinitrophénylhydrazones au moyen de la chromatographie sur couche mince de cellulose 127
M. Demeaux, P. Bidan. — Étude de l'inactivation par la chaleur de la polyphénoloxydase du jus de Pomme 349
P. Dupuy, J. Maugenet, J.-N. Morfaux. — Accroissement de la teneur en stérols dans les levures irradiées au cours de leur culture 295
P. Dupuy, J. Maugenet, J.-N. Morfaux. — Répartition de l'ergostérol dans les cellules de *Saccharomyces cerevisiae* provenant de cultures irradiées 327
M. Feuillat, J. Bergeret. — Étude de quelques facteurs conditionnant la filtration des vins nouveaux 79
M. Flanzy, P. Dupuis, C. Poux, P. André. — Fermentation du jus de raisin en continu. Étude de laboratoire 311
P. Galzy, C. Bizeau. — Étude génétique de mutants « colonie lisse » sélectionnés par culture sur acide acétique 289
G. Guimberteau, E. Peynaud. — Comparaison de quelques méthodes de dosage de l'acide lactique dans les vins 303
M. Jemmali. — Sur le comportement de deux types de microorganismes et de différents enzymes en présence de produits de la réaction de Maillard .. 5
B. Monties, P. Jacquin. — Valeur technologique du dosage des tanins dans les jus de Pomme 335
Andrée Ournac. — Corps interférant dans le dosage de l'acide ascorbique par la dinitrophénylhydrazine dans les jus de raisin et les vins..... 113
Andrée Ournac. — Évolution de l'acide ascorbique pendant la fermentation alcoolique du jus de raisin frais et du jus de raisin désulfité et la conservation des vins correspondants 181
Andrée Ournac, C. Poux. — Acide ascorbique dans le raisin au cours de son développement 193
C. Poux. — Polyphénoloxydase dans le raisin 149
D. Tercelj. — La diminution des composés azotés dans le vin par différents collages 73

Note de laboratoire.

M. Bourzeix, P. Baniol. — L'isolement des flavonols du vin par chromatographie sur couche mince de cellulose 211

Chronique des livres. 403

CONTENTS

Lucette André. — Identification of carbonyl compounds and determination of acetaldehyde in some wines by gas chromatography 159

P. Barre. — Research on lactic acid bacteria of wine. I. — Isolation and classification 173

P. Barre. — Rapid determination of the optical nature of the lactic acid produced in bacterial fermentations. Its applications in the classification of the *Lactobacillaceae* winslow and *al.* 203

C. Bayonove. — A study of three methods of determining reducing sugars.... 139

J. Blouin. — Contribution to the study of the binding of sulphur dioxide in musts and wines. First part 223

Second part 359

J. Chauvet, P. Bréchot, Madeleine Croson, R. Irrmann. — Study of anaerobic growth of yeasts during vinification under full maceration. 99

L. Deibner, Mireille Cabibel-Hugues. — Electrophotometric dosage of the pyruvic and α-cetoglutaric acids in grape juices and wines after separation of their dinitrophenylhydrazones by chromatography on thin cellulose layer..... 127

M. Demeaux, P. Bidan. — A study of the inactivation of apple-juice polyphenoloxidase by heat 349

P. Dupuy, J. Maugenet, J.-N. Morfaux. — Increasing the sterol content of yeasts irradiated during their development 295

P. Dupuy, J. Maugenet, J.-N. Morfaux. — Repartition of ergosterol in the cells of *S. cerevisiae* obtained from irradiated cultures 327

M. Feuillat, J. Bergeret. — A study of some factors affecting the filtration of new wines 79

M. Flanzy, P. Dupuis, C. Poux, P. André. — Continuous fermentation of grape juice. A laboratory study 311

P. Galzy, C. Bizeau. — Genetic study of « smooth colony » mutants selected by culture on acetic acid 289

G. Guimberteau, E. Peynaud. — A comparison of some methods of determining lactic acid in wines 303

M. Jemmali. — On the behaviour of two types of microorganisms and of different enzymes in the presence of Maillard reactions products 5

B. Monties, P. Jacquin. — Technological value of the determination of tannins in apple juices 335

Andrée Ournac. — Substances interfering with the dinitrophenylhydrazine method of determining the ascorbic acid content of wines and grape juice. 113

Andrée Ournac. — Evolution of ascorbic acid during alcoholic fermentation of fresh and desulphited grape juice and storing of the corresponding wines 181

Andrée Ournac, C. Poux. — Ascorbic acid in the developing grape..... 193

C. Poux. — Polyphenoloxydase in grapes 149

D. Tercelj. — Reduction of nitrogenous compounds in wine by different clarification methods 73

Laboratory note.

M. Bourzeix, P. Baniol. — Isolation of flavonols from wine by thin-layer chromatography on cellulose 211

Book review..... 403

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le manuscrit doit être dactylographié sur papier format 21 × 27, avec un double interligne, au recto seulement. Chaque page sera numérotée et des feuilles séparées seront utilisées pour les références bibliographiques, les tableaux, les légendes des figures et graphiques, etc.

Au début de chaque mémoire, on indiquera : — *le titre du mémoire :* il ne devra pas comporter d'abréviation ni de formules chimiques (sauf pour les isotopes) ; — *le nom des auteurs,* précédé des initiales du prénom pour les hommes, du prénom complet pour les femmes ; *le nom des techniciens* ayant collaboré à l'étude relatée, précédé de la mention: avec la collaboration technique de... ; — *le nom de l'établissement,* dans equel ont été effectuées les recherches et son adresse.

Les mémoires seront rédigés, autant que possible, d'après le plan ci-dessous :
a) *sommaire :* résumé suffisamment précis pour que sa lecture renseigne sur la nature du travail et son importance ; b) *introduction* dans laquelle on indique l'objet des recherches entreprises en relation avec les travaux déjà effectués dans le domaine ; c) *techniques expérimentales et matériel utilisé,* en donnant sous une forme concise, tous les détails nécessaires pour que le lecteur puisse répéter les expériences ; d) *résultats* à présenter de la manière la plus brève possible ; e) *discussion et conclusion ;* f) *résumé* destiné à être traduit en anglais comportant une analyse *complète* de l'article ; g) *remerciements* pour les collaborations, les fonds les dons... ; h) *références bibliographiques.*

Les travaux originaux en anglais doivent présenter la même composition que les mémoires rédigés en français, mais ils comportent obligatoirement un résumé français très *complet* placé en tête de l'article. Les figures, graphiques, tableaux et photographies seront sous-titrés en français.

Pour les autres documents (notes, mises au point, revues rapports, etc.) l'auteur devra suivre un plan logique et le mettre en évidence par une titration appropriée.

Les références bibliographiques doivent être citées dans le texte de la manière suivante : (Dupont et Duval, 1954). Lorsque la référence comporte plus de trois auteurs, seul le premier auteur sera mentionné, suivi de *et al.* A la fin de l'article, les références constituant la bibliographie doivent être citées par ordre alphabétique des noms d'auteurs, et par ordre de dates pour un même auteur.

Pour les articles : le (s) nom (s) de (s) auteur (s) suivi (s) des initiales du (des) prénom (s) ; la date de parution de l'article ; le titre de l'article (dans la langue originale pour l'allemand, l'anglais, l'italien, l'espagnol et en français dans tous les autres cas, avec indication entre parenthèses de la langue d'origine, sauf si l'auteur étranger a sous-titré dans l'une des quatres langues mentionnées) : le titre du périodique en abrégé, selon le World List of Scientific Periodicals, où le Bulletin Signalétique du C.N.R.S. ; le volume ; la première et la dernière page de l'article.

Pour les ouvrages : le nom de l'auteur avec les initiales du prénom ; la date de l'édition ; le titre complet de l'ouvrage dans la langue originale, sans abréviations (pour les langues utilisant des alphabets autres que l'alphabet latin, la traduction du titre sera donnée entre parenthèses, avec mention de la langue d'origine) ; le volume ; la première et la dernière page du paragraphe se rapportant aux résultats discutés, et, si l'on cite l'ouvrage en entier, le nombre de volumes et le nombre total de pages ; le numéro de l'édition s'il y en a plusieurs ; le nom de l'éditeur ; le lieu de l'édition. Si l'ouvrage est collectif, on indiquera en plus le nom de l'auteur du chapitre cité, le nom des rédacteurs principaux, précédé de la mention « in », le titre de l'ouvrage.

La mention de « communication personnelle » ou « données non publiées » etc. doit être faite entre parenthèses. Lorsque l'auteur a relevé une référence dans une revue d' « Abstracts », le mentionner à la fin de la référence, entre parenthèses.

Les tableaux, dessins, graphiques, cartes, photographies, doivent être fournis à part. Les tableaux et figures doivent faire l'objet de deux numérotations distinctes, en chiffres arabes l'une et l'autre.

Les auteurs peuvent disposer leurs tableaux soit dans le sens de la largeur de la revue, soit dans le sens de la longueur. Dans le sens de la largeur, le total des signes et des espaces disponibles est de 100. Dans le sens de la longueur, il est de 155. Les tableaux en longueur, c'est-à-dire ceux pouvant disposer de 155 signes, ne seront admis que s'ils comprennent plus de 8 lignes de chiffres, de manière qu'une page entière de la revue ne soit pas occupée par un tableau très long et très étroit.

Les graphiques ne doivent pas faire double emploi avec les tableaux.

Les légendes et les énoncés des graphiques et dessins doivent être dactylographiés sur feuille séparée, et porter les numéros des figures.

Les graphiques, schémas, cartes, dessins d'appareils seront envoyés *à l'état de projets,* leur exécution définitive étant confiée au Bureau de Dessin de l'I. N. R. A. Seules deux réductions à l'impression sont admises : *soit* × 0,5, *soit* × 0,25.

Il est rappelé que le format utile des Annales est : 16 × 24 cm ; ces dimensions ne doivent pas être dépassées.

Photographies : Il est recommandé de fournir des épreuves bien contrastées sur papier blanc, et de préférence en format 9 × 12. Si les photographies doivent être associées pour constituer des planches, on adoptera les normes suivantes : 2 photos 9 × 12, 4 photos 9 × 5,5, 6 photos 5,5 × 5,5. Dans ce cas, chaque photo devra porter un numéro en chiffres arabes visible après clichage.

Les légendes des photographies doivent être dactylographiées sur feuilles séparées et porter les numéros des figures.

Correction des épreuves : les auteurs recevront deux épreuves à corriger. Les corrections « d'auteur » ne sont autorisées que sur le premier jeu d'épreuves.

Envoi du manuscrit : M. Flanzy, Station centrale de Technologie des produits végétaux, 11 - Narbonne France, ou M. Mocquot, Station centrale de Technologie des Produits animaux, 78 - Jouy-en-Josas. Envoyer deux exemplaires.